



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลไกส่งถ่ายสัญญาณจากแรงกดเชิงกลต่อการแสดงออกของออสติโอพอนทิน  
และรีเซปเตอร์ แอคทีเวเตอร์ ออฟเอ็นเอฟแคบปาปีไลแกน ในเซลล์เอ็นดอทีลียัล

โดย รศ. ทพ. ประสิทธิ์ ภาวสันต์ และคณะ

มีนาคม 2554

สัญญาเลขที่ RSA5180004

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ กลไกส่งถ่ายสัญญาณจากแรงกดเชิงกลต่อการแสดงออกของออสติโอพอนทิน  
และรีเซปเตอร์ แอคทีเวเตอร์ ออฟเอ็นเอฟแคบปาปีไลแกน ในเซลล์เอ็นดปริทันต์

รศ. ทพ. ประสิทธิ์ ภาวสันต์

รศ. ทญ. ทศนีย์ ยงชัยตระกูล

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กลไกส่งถ่ายสัญญาณจากแรงกดเชิงกลต่อการแสดงออกของออสติโอพอนทินและรีเซปเตอร์

### แอกทิเวเตอร์ ออฟเอ็นเอฟแคบปาบี ไลแกนในเซลล์เอ็นดอทีลียัล

#### บทคัดย่อ

เซลล์เอ็นดอทีลียัล เป็นเซลล์ที่ต้องสัมผัสกับแรงอยู่เกือบตลอดเวลา เช่นเดียวกับเซลล์กระดูก ทั้งนี้ เพื่อรักษาสสมดุลของเนื้อเยื่อปริทันต์ และป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับกระดูกเข้าฟัน และอันตรายต่อตัวฟัน เพื่อให้ฟันสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการศึกษารั้วนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแรงกดเชิงกลที่มีต่อเซลล์เอ็นดอทีลียัล โดยเฉพาะในแง่ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนออสติโอพอนทินและ รีเซปเตอร์ แอกทิเวเตอร์ ออฟนิวเคลียร์แฟคเตอร์ แคบปาบีไลแกน หรือ แรงคไลแกน รวมทั้งกลไกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ในการทดลองจะใช้ เซลล์เอ็นดอทีลียัลที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อปริทันต์ ของฟันของผู้ป่วยที่มาถอนฟันเพราะเป็นฟันคุด หรือเพื่อการจัดฟัน และกระตุ้นเซลล์ด้วยแรงกดเชิงกลโดยตรง การวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับอาร์เอ็นเอเข้ารหัส และระดับโปรตีน จะทำด้วยวิธี รีเวอร์ส ทรานส์คริปชัน โพลีเมอร์เรสเซนซ์แอกชัน และเวสเทิร์น ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า แรงกดเชิงกลกระตุ้นการเปิด เฮมิแซนแนล บนผิวเซลล์ โดยเฉพาะ คอนเนคซิน 43 และปลดปล่อย อะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต หรือ เอทีพี ออกจากเซลล์ และ เอทีพีจะทำหน้าที่เป็นไลแกน กระตุ้นการทำงานของตัวรับ พี 2 วายบนผิวเซลล์ โดยผลของการกระตุ้นตัวรับพี 2 วาย1 จะทำให้ระดับการสร้างโปรตีนและการแสดงออกของออสติโอพอนทินเพิ่มขึ้น รวมทั้งเพิ่มการหลั่ง พรอสตาแกลนดิน อี2 มากขึ้น และนำไปสู่การเพิ่มระดับการแสดงออกและการสร้างโปรตีนแรงคไลแกน โดยการเพิ่มขึ้นของออสติโอพอนทินและแรงคไลแกน อาจจะมีผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์ทำลายกระดูกได้ กล่าวโดยสรุป แรงกดเชิงกล สามารถกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์เอ็นดอทีลียัลได้โดยตรง เช่นเดียวกับเซลล์กระดูก และผลของแรงกดเชิงกลสามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายกระดูกสองชนิด คือ ออสติโอพอนทินและแรงคไลแกนผ่านการทำงานของเอทีพีและตัวรับพี2 ผลการทดลองนี้ ชี้ถึงบทบาทใหม่ของเอทีพี ตัวรับพี2วาย และเฮมิแซนแนลโปรตีนที่สัมพันธ์กับการควบคุมการทำงานของเซลล์เอ็นดอทีลียัลที่ตอบสนองต่อแรงกดเชิงกล

The signaling pathway of mechanical stress on the expression and receptor activator of NFkB  
ligand in human periodontal ligament cells

Abstract

The function of periodontal ligament (PDL) cells is to control homeostasis and prevent damage of periodontal tissue in order to maintain the function of the tooth. Therefore, these cells, similar to osteoblast, always receive the mechanical stress from the mastication, speech and orthodontic forces. The aims of this study are to examine the effect of mechanical stress on PDL cells, particularly on the expression of osteopontin (OPN) and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) and the mechanisms involved. PDL cells were established from periodontal tissue of extracted wisdom teeth or teeth extracted for orthodontic treatment. PDL cells were treated with compressive forces and the changes in the expression and synthesis of OPN and RANKL were observed by reverse transcription polymerase chain reaction and Western analysis, respectively. The results showed that compressive force directly induced the opening of hemichannel gap junction, especially connexin43 (Cx43) in PDL cells, resulted in the release of ATP into extracellular space. Extracellular ATP could activate the P2 receptor on the cell surface. Activation of P2Y, especially P2Y1 receptor increased the expression and synthesis of OPN and also induced the release of prostaglandin E2 (PGE2). Subsequently, PGE2 induced the expression and synthesis of RANKL. Increase of OPN and RANKL could facilitate the differentiation and activation of osteoclast. In conclusion, this study reveals the novel function of ATP, P2Y receptor and hemichannel proteins in the regulation of PDL cell function.

## Executive Summary

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษากลไกของแรงกดดันเชิงกลที่กระตุ้นการแสดงออกของ RANKL และ OPN ในเซลล์เอ็นโดปริทีนตีในแง่ของ
  - (1) ความสัมพันธ์ของการกระตุ้นด้วยแรงกดดันเชิงกลในการกระตุ้นการหลั่ง ATP
  - (2) ผลของ ATP ที่ถูกหลั่งออกมากับการกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL และ OPN
  - (3) ความสัมพันธ์ของ P2 receptors (ATP receptor) กับการกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL และ OPN
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ P2 receptor subtypes ในเซลล์เอ็นโดปริทีนตีมนุษย์ ในแง่ของ
  - (1) ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ P2 receptor ต่างๆ กับ ระยะต่างๆในการเติบโต (Differentiation stage) ของเซลล์เอ็นโดปริทีนตี
  - (2) ความสัมพันธ์ในการกระตุ้นด้วยแรงกดดันเชิงกลกับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ P2 receptor ชนิดต่างๆ
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ (Crosstalk) ระหว่างสัญญาณของ P2 receptors กับสัญญาณอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL และ OPN จากแรงกดดันเชิงกลในเซลล์เอ็นโดปริทีนตีมนุษย์ ได้แก่ ความสัมพันธ์ระหว่าง P2 receptors กับ COX-2 ในการกระตุ้น RANKL และกับ Rho kinase ในการกระตุ้น OPN

### ผลการดำเนินการพบว่า

1. แรงกดดันเชิงกลสามารถกระตุ้นการหลั่ง ATP ในเซลล์เอ็นโดปริทีนตี
2. การหลั่ง ATP จากผลของแรงกดดันเชิงกล เกิดผ่าน gap junction hemichannel โดยเฉพาะ connexin 43
3. การกระตุ้นการเปิด hemichannel สัมพันธ์กับการเพิ่มระดับแคลเซียมภายในเซลล์ แบบ thapsigargin-sensitive และ IP3-dependent pathway
4. ATP กระตุ้นการแสดงออกของ RANKL และ OPN ในเซลล์เอ็นโดปริทีนตี จะเกิดผ่านทาง P2Y1 receptor
5. การกระตุ้นการแสดงออกของ OPN ในเซลล์เอ็นโดปริทีนตี จะสัมพันธ์กับ Rho kinase

6. Extracellular ATP กระตุ้นการแสดงออกของ RANKL โดยการส่งสัญญาณผ่านทาง P2Y1 receptor และกระตุ้นการทำงานของ PKA/NFkB ซึ่งจะไปเพิ่มการผลิต PGE2 จากนั้น PGE2 จึงจะไปกระตุ้นการสร้าง RANKL
7. เซลล์เอนโดทีลียด์มีการแสดงออกของ P2 receptor หลายชนิด ได้แก่ P2X7, P2Y1, P2Y2 และ P2Y4 receptors
8. เซลล์เอนโดทีลียด์ปล่อย ATP ออกจากเซลล์ผ่านทาง hemichannel เมื่อได้รับแรงกดดันเชิงกล
9. เซลล์เอนโดทีลียด์มีการแสดงออกของ hemichannel หลายชนิด แต่ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการปล่อย ATP เมื่อเซลล์รับแรงกดดันเชิงกล คือ connexin 43

## บทนำ

เนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal tissue) เป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ยึดฟันให้ติดอยู่กับกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) นอกจากนี้ ยังทำหน้าที่ในการพยุงฟันและถ่ายทอดแรงที่ผ่านมาจากฟันไปยังกระดูกเบ้าฟันด้วย

เซลล์ของเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ หรือเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament cells) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมสมดุลของเนื้อเยื่อปริทันต์ (periodontal homeostasis) โดยการควบคุมสมดุลการสร้างและการปรับเปลี่ยน (turnover) ของเนื้อเยื่อปริทันต์ เพื่อรักษาปริมาณของเนื้อเยื่อให้มีความเหมาะสมกับการทำหน้าที่

การที่เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ทำหน้าที่ในการพยุงฟัน ทำให้เซลล์เหล่านี้ ต้องสัมผัสกับแรงอยู่เกือบตลอดเวลา เช่นเดียวกับเซลล์กระดูก โดยในกรณีของกระดูก เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการรับรู้แรง คือเซลล์ osteocytes ซึ่งอยู่ภายในเนื้อเยื่อแข็ง โดยอยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า ลาคูนา (lacuna) เซลล์ osteocytes จะมีแขนงจำนวนมากทอดผ่านไปในทุกที่เล็กๆ ที่เรียกว่า canaliculi โดยท่อเหล่านี้ เป็นช่องทางติดต่อระหว่างลาคูนาโดยรอบ และติดต่อกับเซลล์กระดูก osteoblast ที่ผิวกระดูก ภายในท่อเหล่านี้ จะมี tissue fluid ไหลผ่าน และเมื่อกระดูกได้รับแรง ก็จะทำให้เกิดการบิดตัวของ bone matrix และส่งผลต่อการไหลของ tissue fluid เกิดเป็นแรงเฉือนไปบนผิวเซลล์ osteocytes และกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ มีรายงานว่าแรงสามารถกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของโมเลกุลสื่อสัญญาณภายในเซลล์ (secondary messenger) ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน กระบวนการดังกล่าวนี้ เรียกว่า mechanotransduction (Turner and Pavalko, 1998)

ในกรณีของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ มีรายงานว่า สามารถตอบสนองต่อแรงได้โดยตรงเช่นเดียวกับเซลล์กระดูก โดยการกระตุ้นเซลล์ด้วยแรงกดเชิงกล หรือ แรงดึง สามารถกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีความชัดเจนว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์สามารถรับรู้ต่อแรงได้อย่างไร

ในกรณีของแรงกดเชิงกล (mechanical stress) มีรายงานทั้งในเซลล์กระดูก และในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ว่า สามารถเพิ่มระดับการสร้างและการแสดงออกของโปรตีนที่ชื่อว่า รีเซปเตอร์ แอคทิเวเตอร์ ออฟเอ็นเอฟแคบปายี ไคแกน (receptor activator of NFkB ligand or RANKL) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เหนี่ยวนำดิฟเฟอเรนเชียล และกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) โดยในเซลล์เอ็นยึดปริทันต์กลไกที่เกิดขึ้นส่งสัญญาณผ่านทางไซโคลออกซีจีเนส-2 (Cyclooxygenase-2

หรือ Cox-2) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่แสดงว่า แรงกดเชิงกลสามารถกระตุ้นการทำลายกระดูก (Kanzaki et al., 2002; Yamaguchi et al., 2006; Evans et al., 2006)

อย่างไรก็ดี นอกเหนือจาก RANKL แล้ว ยังมีโปรตีนอีก 2 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ทำลายกระดูก คือ ออสติโอโปรทีเจอริน (osteoprotegerin or OPG) และ ออสติโอพอนทิน (osteopontin or OPN)

ออสติโอโปรทีเจอริน หรือ OPG เป็นโปรตีนที่พบในปี 1997 ทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของเซลล์ทำลายกระดูก โดยการจับกับ RANKL ดังนั้น สมดุลของการสร้าง RANKL และ OPG ในเนื้อเยื่อ เป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ทำลายกระดูก (Simonet et al., 1997; Tsuda et al., 1997)

ออสติโอพอนทิน หรือ OPN ซึ่งเป็นโปรตีนตัวหนึ่งที่สำคัญสำหรับการทำงานของเซลล์ทำลายกระดูก ผลการศึกษาพบว่า OPN ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่และการยึดเกาะของเซลล์ทำลายกระดูก และยังทำหน้าที่เป็นปัจจัยดึงดูดเซลล์ทำลายกระดูก (chemotaxis factor) ให้เข้ามาในบริเวณที่มีการละลายของกระดูกด้วย ความสำคัญของ OPN ต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ทำลายกระดูก จะเห็นได้ชัดจากผลจากการศึกษาในหนูที่ไม่มีการแสดงออกของออสติโอพอนทิน (osteopontin-null mice) โดยจะพบว่า หนูเหล่านี้มีความผิดปกติของกลไกการทำลายกระดูก ซึ่งการขาด OPN อาจส่งผลให้การทำงานของเซลล์ทำลายกระดูกเกิดได้ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากขาดปัจจัยที่ช่วยชักนำการเคลื่อนที่เข้ามาของเซลล์ทำลายกระดูก หรือ ขาดปัจจัยที่สนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์กับผิวกระดูก (Ihara et al., 2001; Ishijima et al., 2002; Chellaiah et al., 2003)

รายงานในสัตว์ทดลองโดย Terai และคณะ (1999) และ Fujihara และคณะ (2006) แสดงผลว่าการเพิ่มแรงกดเชิงกลในกระดูกเข่าผ่านการดัดฟัน สามารถเพิ่มการสร้าง OPN ในเซลล์กระดูก และจากการศึกษาในเซลล์เอ็นโดพริทนต์มนุษย์พบว่าแรงกดเชิงกลสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ OPN ได้เช่นกัน โดยผ่านทางโรฮ์ไคเนส (Rho kinase pathway) (Wongkhantee et al., 2007) แสดงให้เห็นว่า OPN เป็นโปรตีนหลักตัวหนึ่งที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกเมื่อเซลล์เอ็นโดพริทนต์ได้รับแรงกดเชิงกลเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นกับเซลล์กระดูก แต่อย่างไรก็ดี ข้อมูลการศึกษาในเซลล์เอ็นโดพริทนต์ยังมีอยู่น้อยมาก เมื่อเทียบกับการศึกษาในเซลล์กระดูก และกลไกการกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL หรือ OPN จากแรงกดเชิงกลที่มีต่อเซลล์เอ็นโดพริทนต์ก็ยังไม่ชัดเจน



จากการศึกษาในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ พบว่า Rho kinase มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ OPN (Chaulet et al., 2001, Kawamura et al., 2004) และการกระตุ้นนี้เกิดจากการใช้นิวคลีโอไทด์ (Nucleotides) หรือการใช้กลูโคสปริมาณสูง รายงานเหล่านี้ สนับสนุนแนวคิดที่ว่า นิวคลีโอไทด์มีบทบาทสำคัญต่อการแสดงออกของ OPN โดยนิวคลีโอไทด์ชนิดที่รู้จักดีคือ ATP (Adenosine triphosphate) ซึ่งมีรายงานว่า สามารถทำหน้าที่ เป็นตัวส่งต่อสัญญาณภายนอกเซลล์ (extracellular messenger) ในเนื้อเยื่อหลายชนิด (Burnstock and Knight, 2004)

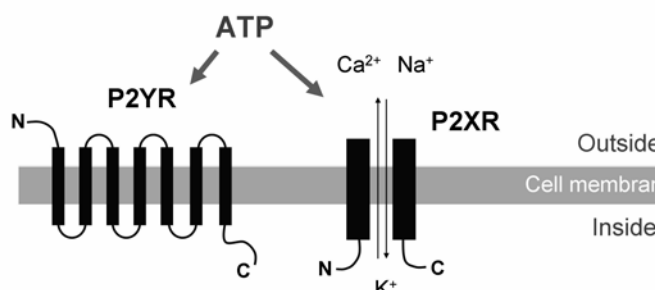
มีรายงานว่าเซลล์หลายชนิด เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแรงเชิงกล จะตอบสนองโดยการหลั่ง ATP ออกมาและ ATP นี้จะส่งต่อสัญญาณผ่านตัวรับ (Receptors) ชนิด Purinergic membrane receptors หรือ P2 receptors (Schwiebert, 2000) การหลั่ง ATP ที่เกิดขึ้นทำหน้าที่เป็นทั้งสารส่งสัญญาณเชิงกล (Mechano-transducer) ผ่านไปยังเซลล์ข้างเคียงหรือตัวเซลล์เอง (Nakano et al., 1997; Yamamoto et al., 2000; Furuya et al., 2005) ตัวอย่างการศึกษาในเซลล์กระดูกพบว่า ATP สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-6 แต่ยับยั้งการแสดงออกของ OPG นอกจากนี้ ATP ยังกระตุ้นการทำงานของเซลล์ออสติโอคลาสผ่านทางกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL (Buckley et al., 2002) จากข้อมูลเหล่านี้จึงกล่าวได้ว่า ATP คือปัจจัยสำคัญตัวหนึ่งในการควบคุมสมดุลย์ของกระดูก

ตัวรับ พี (P receptor) เป็นตัวรับบนผิวเซลล์ที่รับรู้ต่อ พิวรีน (purine) และ ไพริมิดีน (pyrimidine) ซึ่งส่วนใหญ่ ได้แก่ อะดีโนซีน (adenosine), ATP, อะดีโนซีนไดฟอสเฟต (adenosine diphosphate, ADP) และ ยูราซิลไตรฟอสเฟตยูทีพี (uracil triphosphate, UTP) ที่อยู่ภายนอกเซลล์ ตัวรับกลุ่มนี้ แบ่งออกเป็นตัวรับ พี 1 (P1 receptor) และตัวรับ พี 2 (P2 receptor) โดย ligand หลักของ P1 receptor คือ อะดีโนซีน ส่วนไลแกนด์หลักของ P2 receptor คือ นิวคลีโอไทด์ ได และไตรฟอสเฟต ได้แก่ ATP, ADP และ UTP

P2 receptor ถูกค้นพบและรายงานในปี ค.ศ. 1978 และต่อมาพบว่าตัวรับในกลุ่มนี้ สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม คือ พี 2 เอกซ์ (P2X) และ พี 2 วาย (P2Y) ประกอบด้วยสมาชิกเท่าที่ค้นพบในปัจจุบัน 15 ชนิด ได้แก่ P2X 7 ชนิด คือ P2X1, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 และ P2X7 และ P2Y อีก 8 ชนิด คือ P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 และ P2Y14

โครงสร้างของตัวรับ P2X ประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 หน่วย (3 subunits) โดยแต่ละหน่วย มีลักษณะเป็น พุทธานสเมมเบรนโดเมน (two transmembrane domain) เชื่อมต่อกันด้วย ซีสเทอีนลูป (cysteine containing extracellular loop) และหน่วยย่อยเหล่านี้ จะมาประกอบกันเป็นแคตไอออนแชนแนล (cation channels) (ดูรูป) ดังนั้น ในสภาวะปกติ เมื่อกระตุ้นการทำงานของตัวรับ P2X จะทำให้เกิดการไหลผ่านของ โซเดียมไอออน และ แคลเซียมไอออน เข้าสู่เซลล์ และไปแคลเซียมไอออน ผ่านออกจากเซลล์ นำไปสู่การลดลงของความต่างศักย์ของผิวเซลล์ (depolarization) นอกจากนี้ การเพิ่มระดับของแคลเซียมไอออน ยังกระตุ้นการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์ได้ด้วย

ส่วนโครงสร้างของตัวรับ P2Y จะเป็นตัวรับในกลุ่ม เซเวน ทรานสเมมเบรนโดเมน (seven transmembrane domain) ที่มีปลายทางด้านอะมิโน (amino or N-terminus) อยู่ด้านนอกของเซลล์ (extracellular N-terminal) และปลายด้านคาร์บอกซี (carboxy or C-terminus) อยู่ภายในเซลล์ จัดเป็นสมาชิกของกลุ่มตัวรับบนผิวเซลล์ที่ชื่อว่า จีโปรตีนคอปเปิล รีเซปเตอร์ (G-protein coupled receptor; GPCR)



## ภาพแสดงโครงสร้างของตัวรับพี 2

โครงสร้างของตัวรับพี 2 ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ P2X และ P2Y โดยตัวรับ P2X จะมีโครงสร้างเป็น อีออน แชนแนล (ion channel) ส่วนตัวรับ P2Y จะมีโครงสร้างเป็นเซเวน ทรานสเมมเบรนโดเมน (seven transmembrane domain)

เซลล์ในร่างกายเราส่วนใหญ่ จะพบตัวรับ พี 2 อยู่บนผิวเซลล์ อย่างไรก็ตาม เซลล์แต่ละชนิด จะมีชนิด และปริมาณของตัวรับ พี 2 ชนิดย่อยแตกต่างกันไป เช่น ในเซลล์แอสโตรไซต์ (astrocytes) จะพบ P2X1-7 และ P2Y1,2,4,6 เซลล์บุหลอดเลือด

เลือดจะพบ P2X<sub>1,4</sub> และ P2Y<sub>1,2</sub> เซลล์ตับจะพบ P2Y<sub>1,4,6,13</sub> ในขณะที่เซลล์สลายกระดูกจะพบ P2X<sub>2,4,7</sub> และ P2Y<sub>1,2</sub> (Hoebertz et al., 2003) สำหรับเซลล์เอ็นโดทีเลียล จะพบการแสดงออกของ P2X<sub>7</sub> และ P2Y<sub>1,2,4</sub> (งานวิจัยครั้งนี้)

ดังกล่าวแล้วว่า ไกลแคนด์หลักตัวหนึ่งของ ตัวรับ พี 2 คือ ATP ซึ่งโดยปกติแล้ว ATP จะถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการสลายน้ำตาล หรือไขมัน ภายในเซลล์ และทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานภายในเซลล์ โดย ATP จะเป็นตัวส่งผ่านพลังงานไปยังโมเลกุลต่างๆ สำหรับกิจกรรมภายในเซลล์ นอกจากนี้ ATP ยังเป็นซับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์ อะดีนิเลท ไซเคเลส (adenylate cyclase) เพื่อสร้าง ไซคลิก อะดีโนซีน โมโน ฟอสเฟต หรือ ไซคลิก เอเอ็มพี (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) ที่เป็นโมเลกุลส่งถ่ายสัญญาณ (signal transduction) ที่สำคัญภายในเซลล์ (Wang et al., 2004)

นอกจากบทบาทภายในเซลล์แล้ว ATP ยังทำหน้าที่เป็นโมเลกุลสื่อสัญญาณภายนอกเซลล์ได้ด้วย ในกรณีของเซลล์ประสาท ATP จัดเป็นโมเลกุลสำคัญ ที่ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลสื่อประสาท (neurotransmitter) โดยพบอยู่ใน ซินแนปติก เวสสิเคิล (synaptic vesicle) ของปลายประสาท ทั้งในระบบประสาทอัตโนมัติชนิด ซิมพาเทติก (sympathetic) และในระบบประสาทรับความรู้สึก นอกจากนี้ ATP ยังทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัว การแปรสภาพ และการตายแบบการขจัดตัวเอง (apoptosis) ในเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น ผิวหนัง กล้ามเนื้อ กระดูก และ ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) โดยส่งสัญญาณผ่านทางตัวรับ พี 2

ผลของ ATP ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ผ่านทางตัวรับ พี 2 โดยเฉพาะในกรณีของตัวรับ P2Y พบว่าส่วนใหญ่จะไปกระตุ้นการทำงานของ ฟอสโฟไลเปส ซี (phospholipase C; PLC) ซึ่งจะสังเคราะห์อินอสิทอล ไตรฟอสเฟต (inositol triphosphate, IP3) และเพิ่มระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ กระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อะดีนิเลท ไซเคเลส ซึ่งนำไปสู่การสร้าง cAMP รวมทั้งการควบคุมการทำงานของ อีออน แชนแนล

บทบาทของ ATP ในเซลล์เอ็นโดทีเลียลของมนุษย์ยังมีน้อยมาก มีเพียงรายงานโดย Kawase และคณะ ที่แสดงว่า ATP สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์ และน่าจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการผลัดเปลี่ยน (Regeneration) ของเนื้อเยื่อปริทันต์ (Kawase et al., 2007) ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL และ OPN จากการถูกกระตุ้นด้วยแรงกดเชิงกลจะช่วยเพิ่มความเข้าใจในชีววิทยาของเซลล์เอ็นโดทีเลียล และช่วยเพิ่มความเข้าใจถึงอิทธิพลของแรงที่กระทำต่อฟันและเนื้อเยื่อเอ็นโดทีเลียล ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ทางทันตกรรมต่อไป

## วิธีการทดลอง

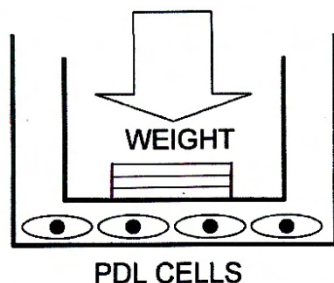
### การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ของมนุษย์

เซลล์เอ็นยึดปริทันต์จะถูกเพาะเลี้ยงขึ้นจากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ของผู้ป่วยที่มาถอนฟันที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ ที่ไม่มีรอยโรคของฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์ เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อที่ได้จากคนไข้ อย่างน้อย 3 คนและเตรียมเซลล์โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้คือ นำฟันที่ได้มาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซอลายน์ (Phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อหลายๆครั้ง จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อขูดเนื้อเยื่อปริทันต์ออกจากผิวรากฟันเฉพาะที่บริเวณตอนกลาง (middle 1/3) ของรากฟัน เนื้อเยื่อที่ขูดได้จะถูกตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปวางในจานเลี้ยงเซลล์ (tissue culture dish; Nunc) ขนาด 35 มิลลิเมตร อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่เติม ซีรัม (fetal bovine serum; FBS) ร้อยละ 10, กลูตามีน (glutamine), ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และยาต่อต้านเชื้อรา (antimycotics) อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุกวันจนเซลล์เคลื่อนออกจากชิ้นเนื้อมาอยู่บนจานเลี้ยง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

เมื่อเซลล์บนจานเลี้ยงเจริญจนเต็มพื้นที่ของจานเลี้ยงเซลล์แล้ว เซลล์จะถูกถ่ายออกไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ ขนาด 60 มิลลิเมตร และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 หลังจากนั้นเซลล์จะถูกหว่านใหม่ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-6

### การกระตุ้นเซลล์ด้วย compressive force เพื่อสร้างแรงอัดเชิงกล

เซลล์จะถูกหว่านลงในจานเลี้ยงแบบ 6 หลุม เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจึงกระตุ้นด้วยแรงกดแบบ continuous compressive force โดยใช้ภาชนะขนาดเล็ก วางลงบนอาหารเลี้ยงเซลล์และเติมน้ำหนักลงไปในช่วงตั้งแต่ 1.5-2.5 กรัม/ตารางเซนติเมตร ตามภาพ



จากภาพ น้ำหนักที่กดลงบนของเหลว จะทำให้เกิดแรงกระทำต่อเซลล์ ตามสมการต่อไปนี้ คือ

$$P = \rho gh$$

เมื่อ  $P$  = pressure,  $\rho$  = density of fluid,  $g$  = acceleration due to gravity และ  $h$  = height of fluid โดยที่ ค่า  $\rho$  และ  $g$  เป็นค่าคงที่ และ pressure จะแปรผันตามความสูงของของเหลว ซึ่งขึ้นกับแรงกดบนของเหลว และค่าของ pressure จะเท่ากันโดยตลอดทั้งพื้นผิว (Fox and McDonald, 1978; Munson, 1998)

RNA และโปรตีน จะถูกสกัดเพื่อทำการวิเคราะห์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลองซ้ำสามครั้งจากเซลล์ที่เตรียมจากผู้ป่วย 3 ราย

#### การศึกษากลไกการตอบสนองต่อแรงกดเชิงกลโดยการใช้ตัวยับยั้ง signaling molecules

ในการทดลองเพื่อหากลไกการตอบสนองของเซลล์เอ็นดอทีลียัลที่ติดกับท่อต่อแรงกดเชิงกล เซลล์จะถูกหว่าน และกระตุ้นด้วย compressive force เหมือนที่อธิบายข้างต้น โดยในบางหลุมจะมีการเติมสารยับยั้ง signaling molecules ลงไป 30 นาที ก่อนเริ่มกระตุ้นด้วยแรง โดยสารยับยั้งที่ใช้ ประกอบด้วย suramin (G protein coupled receptor inhibitor), สารยับยั้ง P2Y<sub>1,2</sub> และ P2X<sub>1,3</sub> (NF449), สารยับยั้งเฉพาะ P2Y<sub>1</sub> (MRS2179), สารทำลาย ATP (Apyrase), Rho kinase inhibitor, สารยับยั้ง cyclooxygenase (indomethacine) เป็นต้น ส่วนตัวยับยั้งอื่นๆ สามารถดูรายละเอียดได้ในบทความในภาคผนวก

การเลือกใช้สารยับยั้งเหล่านี้ เลือกตามที่ได้มีรายงานว่า suramin สามารถยับยั้งการทำงานของ G-protein coupled receptor ซึ่งเป็นกลุ่มหนึ่งของ P2 receptors โดยจากผลการทดลองที่แล้วของคณะวิจัยพบว่า Rho kinase เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ OPN และมีรายงานว่า G-protein coupled receptor เป็น receptor ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ

Rho kinase และเลือกใช้ NF449 เนื่องจากช่วยจำกัดกลุ่มย่อยของ P2 receptor ให้เล็กลง นอกจากนั้นการเลือกใช้ MSR2179 จะช่วยจำเพาะ receptor ที่เกี่ยวข้องให้ชัดเจนขึ้น

นอกจากนี้ จะมีการใช้ ligand ของ P2 receptor ร่วมด้วย โดยเลือกใช้ ATP เนื่องจากเป็น universal P2 receptor ligand ที่สำคัญ และศึกษาร่วมกับการใช้สารยับยั้ง cyclooxygenase และ สารยับยั้ง Rho kinase เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของสัญญาณในการควบคุมการแสดงออกของ RANKL และ OPN ตามลำดับ (มีรายงานว่า แรงกดเชิงกล มีผลกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ได้ ผ่านทางการกระตุ้นการหลั่ง พลอสตาแกลนดิน จากอิทธิพลของเอนไซม์ cyclooxygenase รวมถึงรายงานถึงความสัมพันธ์ของ Rho kinase กับการแสดงออกของ OPN) ส่วนการทำลาย ATP ด้วย Apyrase จะช่วยให้เข้าใจกลไกการส่งถ่ายสัญญาณได้ดีขึ้น

#### การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีวิเคราะห์แบบเวสเทิร์นและการจับสัญญาณด้วยเทคนิคฟลูออโรกราฟี

โปรตีนจากเซลล์จะถูกสกัดด้วย RIPA บัฟเฟอร์ จากนั้นจึงวัดปริมาณโปรตีนด้วยชุดวัดโปรตีน และจำนวนโปรตีนที่เท่ากันในแต่ละการทดลองจะถูกแยกด้วยไฟฟ้าใน acrylamide gel (polyacrylamide gel electrophoresis) และเคลื่อนย้ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose) ด้วยไฟฟ้า

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้ ไปย้อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิต่อโปรตีนที่ต้องการศึกษา ได้แก่ต่อ OPN, RANKL, OPG, P2Y1, P2Y2, P2X1, และ P2X3 เป็นต้น ต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase-labeled secondary antibody) สัญญาณของ OPN, RANKL, OPG, P2Y1, P2Y2, P2X1, และ P2X3 จะถูกตรวจสอบด้วยวิธี auto-fluorography โดยการเคลือบแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ย้อมด้วยแอนติบอดีแล้ว ด้วยชุดขยายสัญญาณแบบเคมี (Chemiluminescence detection system) จากนั้นจึงตรวจจับสัญญาณด้วยแผ่นฟิล์มเอกซเรย์

#### การวิเคราะห์ระดับ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR

RNA จากเซลล์ในแต่ละการทดลอง จะถูกแยกด้วย TRI reagent ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต ปริมาณของ RNA ที่แยกได้จะวิเคราะห์ด้วย UV-spectrophotometer ที่ OD 260/280 จากนั้นนำ RNA จำนวน 1 ไมโครกรัมจากแต่ละกลุ่ม

ทดลอง ไปผ่านกระบวนการ reverse transcriptase (RT) โดยใช้เอนไซม์ AMV (avian myeloblastosis virus, Promega) เพื่อสังเคราะห์คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ (complementary DNA) หรือ cDNA ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

cDNA ที่สังเคราะห์ได้ จะถูกนำไปขยายสัญญาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้เอนไซม์ Taq polymerase และใช้ primer ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการศึกษา ได้แก่ OPN, RANKL, OPG, P2Y1, P2Y2, P2X1, และ P2X3 เป็นต้น โดย primers ทั้งหมดจะออกแบบขึ้นจากลำดับของ mRNA ที่ได้มีรายงานแล้วใน database และในทุกการทดลอง จะใช้ primer ต่อ GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) ซึ่งเป็น house keeping gene ในการขยายสัญญาณควบคู่ไปด้วย เพื่อเป็น internal control ของการทดลองในการตรวจสอบว่าปริมาณของ RNA ต้นต้นที่ใช้มีปริมาณเท่ากันในทุกกลุ่ม

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR แล้ว สายพันธุกรรมที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน agarose gel ที่มีความเข้มข้นของ agarose ร้อยละ 1.5 และความเข้มข้นของแถบสัญญาณจะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Scion image analysis

#### การวัดปริมาณ ATP ด้วย Luciferin-Luciferase bioluminescence assay

การวัดปริมาณ ATP ที่ถูกหลั่งจากเซลล์ออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำหลังจากการกระตุ้นเซลล์ด้วยแรงกดเชิงกลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่กระตุ้นด้วยแรงกด 1, 1.5 และ 2 กรัม/ตารางเซนติเมตร กับกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้น วิธีการวัดทำได้โดยใช้สารเคมีชุดที่ออกแบบมาเพื่อการวัด ATP โดยเฉพาะ (Bioluminescence Detection kit for ATP measurement, Promega) โดยการผสมสารละลาย Luciferase/luciferin (L/L solution) จากชุดที่ได้มากับอาหารเลี้ยงเซลล์ หลังการกระตุ้นด้วยแรงกดเชิงกลในปริมาณ 1 ต่อ 1 ( L/L solution 100 ไมโครลิตร / อาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร) ลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (ยี่ห้อ Packard) ซึ่งจะมีการเรืองแสง Bioluminescence ออกมามากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณ ATP ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำการตรวจวัดปริมาณแสงด้วยเครื่องวัดแสง Luminometer (Victor Light Luminescence Counter, Perkin Elmer Ltd.) ทำค่าที่ได้มาเขียนกราฟและเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve)

### ผลการศึกษา

ผลการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ จะแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ตามบทความที่ได้รับการตีพิมพ์ ดังนี้

Part I. Mechanical stress induces osteopontin via ATP/P2Y1 in periodontal cells.

(Published in Journal of Dental Research 2008;87(6):564-568.)

Part II. ATP stimulates RANKL expression through P2Y1/COX-dependent pathway in human periodontal ligament cells.

(Published in Journal of Periodontal Research 2010; 45: 404-411)

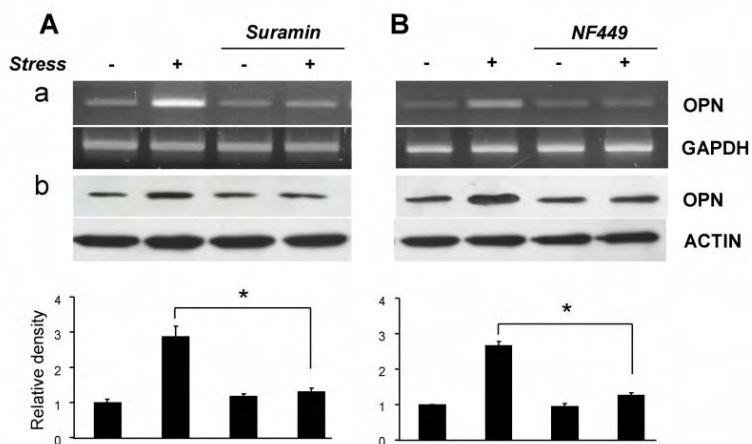
Part III. The role of Connexin43-hemichannels in mechanical stress-induced ATP release from human periodontal ligament cells.

(Accepted manuscript, Journal of Periodontal Research)



# Part I Mechanical stress induces osteopontin via ATP/P2Y1 in periodontal cells

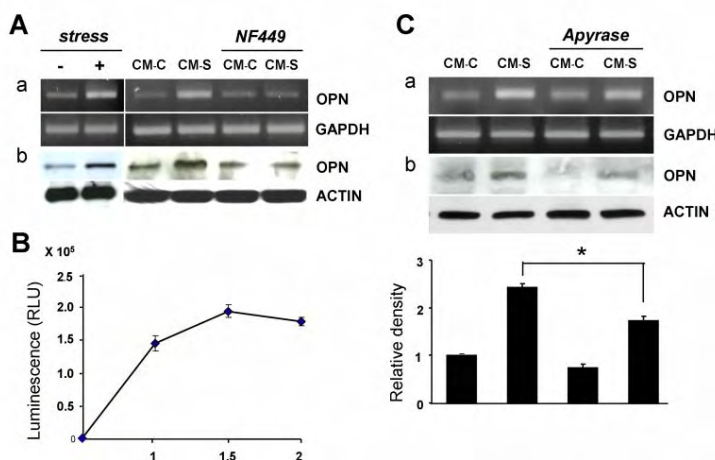
งานวิจัยในส่วนแรก เป็นการศึกษาถึงรายละเอียดของกระบวนการที่แรงกดเชิงกลเหนี่ยวนำการแสดงออกของออสติโอพอนทิน ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลปริทันต์



**Figure 1.** Stress-induced OPN expression was inhibited by suramin and NF449. HPDL cells were stimulated with 1.5 g/cm<sup>2</sup> of force for 24 hrs. Increased OPN mRNA (a) and protein (b) expression was observed. The stress-induced OPN expression was significantly abolished by both suramin (A) and NF449 (B). The graph represents the band density from Western blot analysis. The results are expressed as mean  $\pm$  SD from 3 different experiments. \*p < 0.05.

รูปที่ 1 แสดงผลของแรงกดเชิงกลในการกระตุ้น OPN ในเซลล์เอ็นดอทีลียัลปริทันต์ โดยเซลล์เอ็นดอทีลียัลปริทันต์จะถูกกระตุ้นด้วยแรงกดเชิงกลในขนาด 1.5 กรัม/ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงตรวจสอบการแสดงออกของ OPN โดยในแถว (a) แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับ RNA ด้วยวิธี RT-PCR และแถว (b) แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน และใช้ระดับการแสดงออกของ GAPDH และ beta actin เป็น internal control และกราฟได้รูป แสดงความเข้มของ band ในแถว (b) โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำสาม ด้วยเซลล์ 3 lines

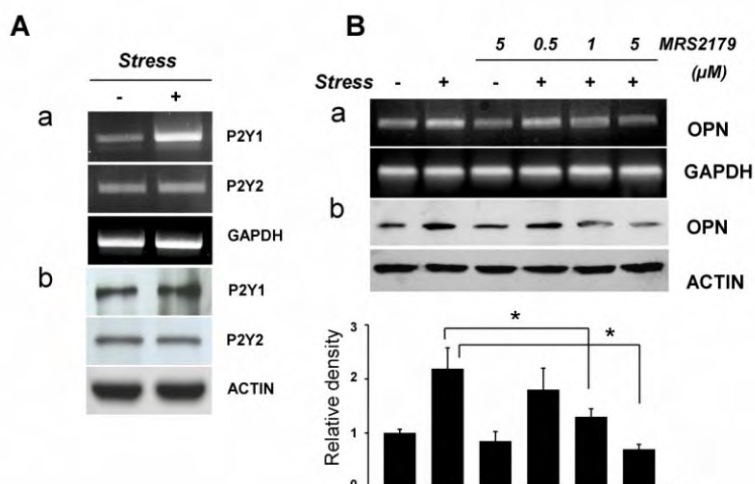
ผลการทดลองในรูปที่ 1 แสดงว่า แรงกดเชิงกล สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ OPN ทั้งในระดับ RNA และระดับโปรตีน และการเหนี่ยวนำนี้ สามารถยับยั้งได้ด้วย suramin และ NF449 ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง P2 receptor โดยทั่วไป และตัวยับยั้ง เฉพาะต่อ P2 receptor 4 ตัว ได้แก่ P2X1, P2X3, P2Y1, และ P2Y2 ผลการทดลองแสดงว่า การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ OPN นี้ น่าจะเกิดผ่านการกระตุ้น P2 receptor โดยเฉพาะ P2X1, P2X3, P2Y1, และ P2Y2



**Figure 2.** The conditioned medium (CM-S) induced the expression of OPN. **(A)** Cells were incubated for 24 hrs with the medium transferred from the stress-stimulated (CM-S) and non-stimulated (CM-C) cultures. CM-S induced OPN expression when compared with control (CM-C). The inductive effect exerted by CM-S was similar to that resulting from stress (S) and could be inhibited by NF449. **(B)** The Luciferin-Luciferase bioluminescence assay revealed that the amount of ATP in the medium collected from stress-stimulated cultures (1, 1.5, 2 g/cm<sup>2</sup>) was increased. **(C)** Apyrase partially inhibited the CM-S-induced OPN expression. The graph shows the band density from Western blot analysis. The results are expressed as mean  $\pm$  SD from 3 separate experiments. \* $p < 0.05$ ; a, mRNA expression; b, protein expression.

การทดลองถัดมาเป็นการตรวจสอบบทบาทของ ATP เนื่องจาก ATP เป็น ligand ที่ทำคัญของ P2 receptor ผลการทดลองในรูป 2A เป็นการทดลองกระตุ้นเซลล์ด้วย condition medium ที่เก็บจากจากเซลล์ในกลุ่มควบคุม (CM-C) เปรียบเทียบกับ condition medium ที่เก็บจากเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับแรง (CM-S) ผลการทดลองแสดงว่า เซลล์เอ็นอีบริตันต์ที่ได้รับ CM-S จะมีระดับการแสดงออกของ OPN เพิ่มขึ้น ทั้งในระดับ RNA (a) และระดับโปรตีน (b) ซึ่งสนับสนุนว่า ผลของแรงกดเชิงกลไม่ได้เกิดโดยตรงแต่เกิดผ่านสารที่เซลล์หลั่งออกมาเมื่อได้รับแรงกระตุ้น และสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์

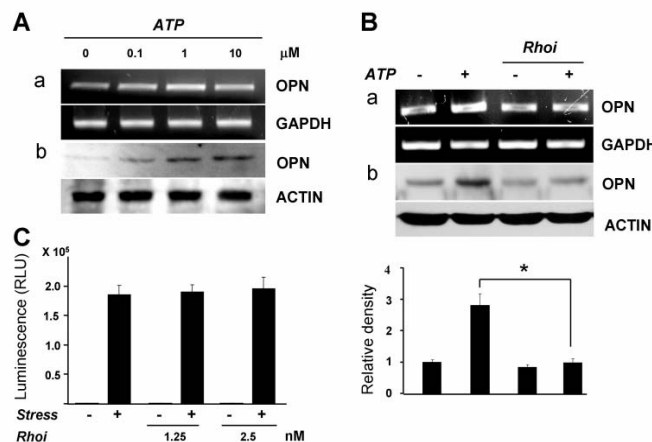
เมื่อนำ condition medium ไปตรวจสอบระดับของ ATP ก็พบว่า ระดับของ ATP เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ และการเพิ่มขึ้นนี้ จะแปรผันตามแรงที่เซลล์ได้รับ และเพื่อยืนยันบทบาทของ ATP ในอาหารเลี้ยงเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกบ่มด้วย เอนไซม์ apyrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อย ATP ได้ ผลการทดลองในรูป 2B แสดงว่า ความสามารถในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ OPN จะลดลง เมื่อcondition medium ถูกย่อยด้วย Apyrase ซึ่งสนับสนุนว่า ATP ใน condition medium เป็นตัวที่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำการแสดงออกของ OPN



**Figure 3.** HPDL cells expressed P2Y1 and P2Y2 ATP receptors. **(A)** HPDL cells expressed P2Y1 and P2Y2 receptors detectable at both mRNA and protein levels. **(B)** MRS2179, a specific P2Y1 antagonist, exerted an inhibitory effect on the stress-induced OPN expression in a dose-dependent manner. The graph represents the mean  $\pm$  SD of the band density from Western blot analysis. The data are from 3 separate experiments. \* $p < 0.05$ ; a, mRNA expression; b, protein expression.

จากผลการทดลองข้างต้น เมื่อนำมาประมวลเข้า น่าจะสรุปได้ว่า แรงกดดันกลกระตุ้นการหลั่ง ATP จากนั้น ATP จะเหนี่ยวนำการแสดงออกของ OPN ผ่านทาง P2 receptor ซึ่งน่าจะมี receptor ที่เกี่ยวข้อง 4 ตัว คือ P2X1, P2X3, P2Y1, และ P2Y2 ผลการตรวจสอบเบื้องต้น พบว่า เซลล์เอ็นโดทีลียัมไม่มีการแสดงออกของ P2X1 และมีระดับของ P2X3 น้อยมาก โดยที่มีระดับการแสดงออกของ P2Y1 และ P2Y2 ค่อนข้างสูง ดังแสดงผลบางส่วนไว้ที่รูป 3A (และแสดงผลไว้ในบทนำข้างต้น) ดังนั้น ในการทดลองต่อมา จึงเลือกใช้ ตัวยับยั้งเฉพาะต่อ P2Y1 (MRS2179) เพื่อตรวจสอบความเกี่ยวข้องของ P2Y1 receptor ในการเหนี่ยวนำการแสดง ออกของ OPN

ผลการทดลองในรูปที่ 3B แสดงว่า MRS2179 สามารถลดผลของแรงกดดันในการกระตุ้น OPN แบบ dose dependent ซึ่งสนับสนุนว่า สัญญาณของ P2Y1 เกี่ยวข้องกับกลไกการเหนี่ยวนำนี้



**Figure 4.** ATP induced the up-regulation of OPN via Rho kinase. **(A)** HPDL cells were incubated with exogenous ATP (0.1, 1, and 10  $\mu$ M) for 24 hrs. The results showed that ATP stimulated the expression of OPN in a dose-dependent manner. Cells were incubated with Rho kinase inhibitor (Rhoi) for 30 min before the application of ATP (1  $\mu$ M) or stress (1.5 g/cm<sup>2</sup>) for 24 hrs. The results demonstrated that the increase in OPN expression **(B)**, but not that of ATP **(C)**, induced by stress was abolished by Rhoi. The graph in **(B)** represents the band density from Western blot analysis. The results are expressed as mean  $\pm$  SD from 3 separate experiments. \* $p < 0.05$ ; a, mRNA expression; b, protein expression.

ในการทดลองถัดมา เซลล์เอ็นดีบริพันธ์จะถูกกระตุ้นด้วย ATP ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครโมลาร์ เพื่อยืนยันบทบาทของ ATP ในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ OPN ผลการทดลองในรูปแบบที่ 4A พบว่า ATP สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ OPN ได้ทั้งในระดับ RNA (a) และระดับโปรตีน (b)

เพื่อตรวจสอบกลไกการส่งผ่านสัญญาณที่เกิดขึ้น ผลการทดลองในรูปแบบที่ 4B พบว่า ตัวยับยั้ง Rho kinase สามารถยับยั้งผลของแรงกดในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ OPN แต่ไม่มีผลต่อการหลั่ง ATP เมื่อได้รับแรง (รูปแบบที่ 4C) ซึ่งสนับสนุนว่า แรงกดเชิงกลกระตุ้นการหลั่ง ATP จากนั้น ATP จะส่งสัญญาณผ่าน Rho kinase ไปเหนี่ยวนำการแสดงออกของ OPN

## Part II ATP stimulates RANKL expression through P2Y1/COX-dependent pathway in human periodontal ligament cells

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า แรงกดเชิงกล นอกจากจะกระตุ้นการแสดงออกของ OPN แล้ว ยังสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ RANKL ได้ด้วย (Wongkhantee et al., 2007) ผลการศึกษาใน part I พบว่า การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ OPN เกิดจากการที่แรงกดเชิงกล ไปกระตุ้นการหลั่ง ATP จากเซลล์เอ็นดอทีลียัล ในการศึกษาครั้งนี้ จึงต้องการตรวจสอบว่า ATP เหนี่ยวนำการแสดงออกของ RANKL หรือไม่ อย่างไร

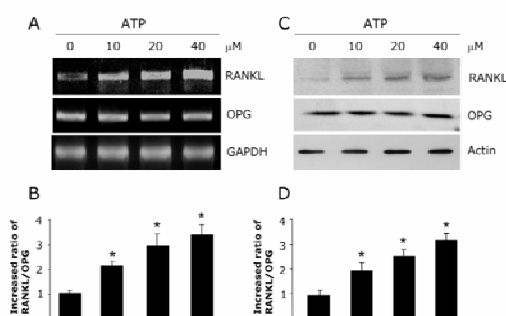


Fig. 1. Adenosine triphosphate induced RANKL mRNA and protein expression. Human periodontal ligament cells were treated with various concentrations of ATP ranging from 0 to 40  $\mu$ M for 16 h for RT-PCR and 48 h for western blot analysis in serum-free conditions. The results from both RT-PCR (A) and western blotting (C) showed that ATP increased the expression of RANKL, but not that of osteoprotegerin (OPG), in a dose-dependent manner. The graphs represent the ratio of RANKL to osteoprotegerin from RT-PCR (B) and western blot analysis (D). The results are expressed as means  $\pm$  SD from three different experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

ผลการศึกษาในรูปแบบที่ 1 พบว่า ATP สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ RANKL ได้ทั้งในระดับ RNA (A) และโปรตีน (C) แปรผันตามความเข้มข้นของ ATP ที่ใช้ แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ OPG การเพิ่มการแสดงออกของ RANKL ทำให้ RANKL/OPG ratio เพิ่มขึ้นตามกราฟในรูป (B) และ (D)

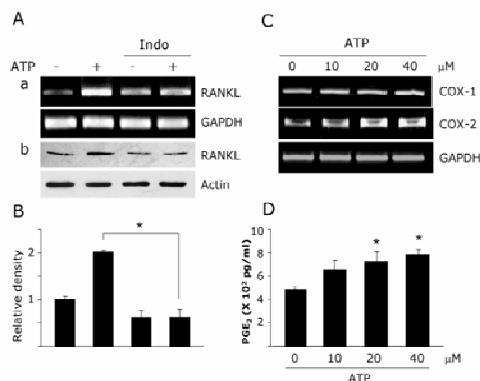


Fig. 2. Adenosine triphosphate-induced RANKL expression was inhibited by indomethacin. (A) Human periodontal ligament cells were treated with 40  $\mu$ M ATP in the presence or absence of indomethacin, a non-specific COX inhibitor, to determine the role of COX in the mechanism. The inhibitor was added 30 min before the treatment. The RNA was extracted at 16 h, and the cell protein extract was collected at 48 h after the treatment. The results showed that application of indomethacin could inhibit the up-regulation of RANKL expression induced by ATP at both the mRNA (Aa) and the protein levels (Ab). The graph (B) represents the band density from western blot analysis when control as marked as 1. The results are expressed as means  $\pm$  SD from three different experiments. (C) Adenosine triphosphate induced COX-2 mRNA after treatment with various concentrations of ATP. The results revealed that the expression of COX-2 increased in a concentration-dependent manner, but not COX-1. (D) The amount of PGE2 in the culture medium was also measured by ELISA after 2 h of exposure to ATP. We found that ATP increased PGE2 production significantly in a dose-dependent manner. The graph shows the mean  $\pm$  SD of band density from three separate experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

Prostaglandin E2 เป็นโมเลกุลที่มีรายงานว่าย่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ RANKL เพื่อตรวจสอบว่า ผลของ ATP ในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ RANKL เซลล์เอ็นดอทีลียด์ถูกกระตุ้นด้วย ATP ในสภาวะที่เดิมด้วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) คือ indomethacin ผลการทดลองในรูปที่ 2 แสดงว่า indomethacin สามารถยับยั้ง ผลของ ATP ในการกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL ได้ (รูปที่ 2A, 2C) นอกจากนี้ เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย ATP พบว่า ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 (รูปที่ 2B) และระดับของ PGE2 เพิ่มขึ้น (รูปที่ 2D) ซึ่งผลการทดลองนี้ แสดงว่า ATP สามารถเพิ่มการสร้างและหลั่ง PGE2 ได้ และ PGE2 น่าจะเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ RANKL

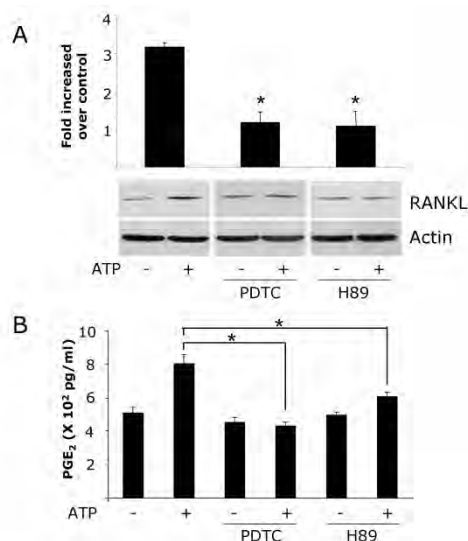


Fig. 3. The stimulatory effect of ATP was abolished by PDTC and H89. Cells were treated with PDTC, an NFkB inhibitor, and H89, a cAMP-dependent protein kinase inhibitor, 30 min before the addition of ATP. The protein extract was collected at 48 h for western blot analysis and the culture medium was collected at 2 h for ELISA after the treatment. The results showed that ATP-induced RANKL (A) and PGE<sub>2</sub> production (B) were inhibited by both PDTC and H89. The effects of forskolin, an activator of adenylyl cyclase, on RANKL expression and PGE<sub>2</sub> release are shown in (C) and (D), respectively. The graph (C) represents the band density from the ratio of RANKL to actin when control as marked as 1. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

โมเลกุลสื่อสัญญาณอีก สองชนิดที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ RANKL ได้แก่ Nuclear Factor kappa B (NFkB) และ Protein Kinase A (PKA) ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลสื่อสัญญาณทั้งสองชนิดกับการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ RANKL โดย ATP เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย ATP ในสถานะที่มีตัวยับยั้งต่อ NFkB (PDTC) และตัวยับยั้งต่อ PKA (H89)

ผลการทดลองในรูปที่ 3A แสดงว่า ตัวยับยั้งทั้งสองชนิด สามารถยับยั้งผลของ ATP ที่มีต่อ RANKL ได้ นอกจากนี้ผลการทดลองในรูป 3B ยังแสดงว่า ตัวยับยั้งทั้งสองนี้ สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ PGE<sub>2</sub> ด้วย บ่งชี้ว่า NFkB และ PKA ควบคุมการแสดงออกของ RANKL ผ่านทางการควบคุมการสร้างและหลั่ง PGE<sub>2</sub>

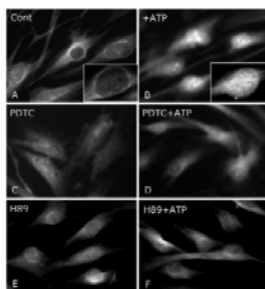


Fig. 4. Nuclear localization of NFkB enhanced by ATP was abolished by PDTC and H89. Human periodontal ligament cells were incubated with or without inhibitor, PDTC or H89, for 30 min before being treated with ATP for 2 h. Immunofluorescent staining showed that ATP enhanced nuclear localization of NFkB (B) when compared with the control treatment (A). The effect of ATP was abolished by PDTC (D) and H89 (F) when compared with their corresponding control cultures (C,E). Scale bar represents 10  $\mu$ m.

NFkB จะทำหน้าที่เป็น transcription factor โดยโมเลกุลนี้จะอยู่ยึดไว้ใน cytoplasm โดย IkB และเมื่อได้รับการกระตุ้น จึงจะหลุดออกจาก IkB และเคลื่อน เข้าใน nucleus ผลการตรวจจพบในรูปที่ 4 โดยการย้อมด้วย antibody ต่อ NFkB พบว่า ในภาวะปกติโมเลกุลนี้ จะอยู่ใน cytoplasm และเมื่อเซลล์เอ็นไคปริทันต์ถูกกระตุ้นด้วย ATP ตำแหน่งที่ย้อมจะปรากฏใน nucleus แสดงว่ามีการเคลื่อนของ NFkB (ภาพแถบบน)

ในแถวล่าง แสดงว่า การเติม PDTC สามารถยับยั้งการเคลื่อนของ NFkB ได้ แสดงว่า PDTC ยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ NFkB ได้ และเช่นเดียวกับแถวล่าง การเติม H89 ก็สามารถยับยั้งการเคลื่อน ของ NFkB เข้าสู่ nucleus ได้เช่นกัน แสดงว่า ในการส่งสัญญาณนี้ PKA น่าจะควบคุมการกระตุ้นการทำงานของ NFkB

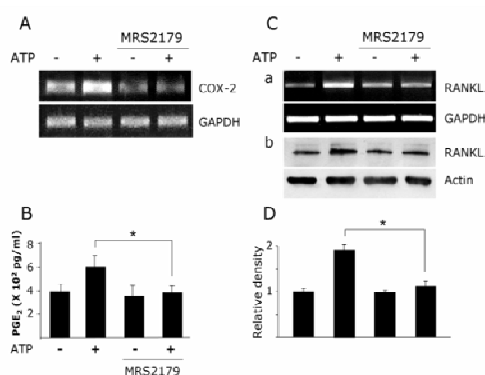


Fig. 5. The effect of MRS2179 on ATP-induced RANKL expression. Cells were pre-incubated with MRS2179, a specific P2Y1 receptor antagonist, for 30 min prior to addition of ATP. After 16 and 48 h of exposure to ATP, the RNA and protein extract were collected for RT-PCR and western blot analysis, respectively. The culture medium from a parallel set of experiments was collected after 2 h of treatment for ELISA. The results showed that MRS2179 exerted an inhibitory effect on the ATP-induced COX-2 expression (A) and PGE<sub>2</sub> production (B). MRS2179 attenuated the ATP-induced RANKL expression at both the mRNA (Ca) and the protein level (Cb). The graph (D) represents the band density from western blot analysis when control as marked as 1. The results are expressed as means  $\pm$  SD from three different experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

ผลการทดลองในรูปที่ 5 แสดงว่า ผลของ ATP ในการกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL (รูปที่ 5C และ 5D) รวมทั้งการกระตุ้นการแสดงออกของ COX-2 (รูปที่ 5A) และการหลั่ง PGE<sub>2</sub> (รูปที่ 5B) ถูกยับยั้งได้ด้วย ตัวยับยั้งต่อ P2Y1 receptor สนับสนุนว่า ATP ส่งสัญญาณผ่าน P2Y1 receptor ไปกระตุ้นการหลั่ง PGE<sub>2</sub> และสุดท้ายกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL



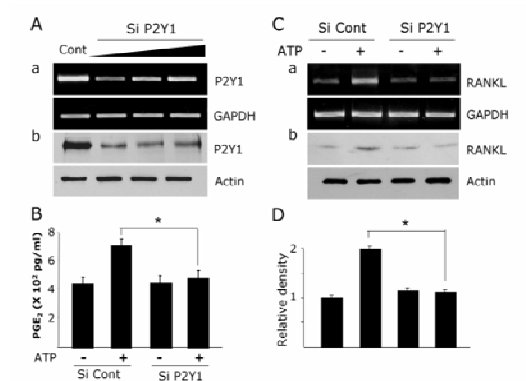


Fig. 6. Adenosine triphosphate-induced up-regulation of RANKL may involve the P2Y1 receptor. Human periodontal ligament cells were transfected with P2Y1 small interfering (Si) RNA. (A) The P2Y1 small interfering RNA could interfere with the expression of the P2Y1 receptor at both the mRNA (Aa) and the protein level (Ab). The P2Y1 small interfering RNA inhibited the release of PGE<sub>2</sub> (B) as well as the expression of RANKL (C). The graph represents the band density from western blot analysis when control as marked as 1 (D). The results are expressed as means  $\pm$  SD from three different experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

เพื่อยืนยันบทบาทของ P2Y1 การแสดงออกของ P2Y1 ในเซลล์เอ็นดอปรีตันต์ถูกยับยั้งด้วยเทคนิค siRNA ในรูป 6A แสดงว่าการใช้ siRNA สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน และระดับการสร้างโปรตีนของ P2Y1 receptor ซึ่งการลดลงของ P2Y1 ทำให้การตอบสนองของเซลล์ต่อ ATP ในการเหนี่ยวนำการหลั่ง PGE<sub>2</sub> (รูปที่ 6B) รวมทั้งลดผลของ ATP ต่อการแสดงออกของ RANKL ด้วย (รูปที่ 6C และ 6D)

### Part III The role of Connexin43-hemichannels in mechanical stress-induced ATP release from human periodontal ligament cells

การศึกษาในส่วนนี้ เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากสองส่วนแรก โดยเป็นการศึกษาการปลดปล่อย ATP จากเซลล์เมื่อได้รับแรงกดเชิงกล โดยผลการทดลองพบว่า ATP จะถูกปล่อยออกมาทาง Connexin (Cx) 43 hemichannels โดย Cx43 จะเปิดออกเมื่อเซลล์ได้รับแรงกดเชิงกล และกลไกการเปิด Cx43 นี้ เกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับแคลเซียมไอออนภายในเซลล์เอ็นอีโดปริทันต์

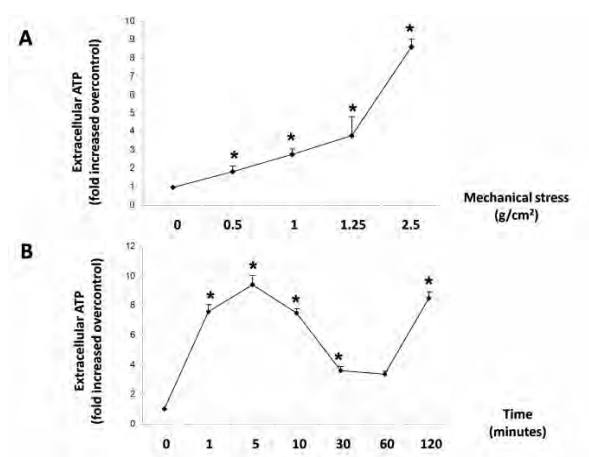


Fig. 1 Mechanical stress-induced ATP release from HPDL cells

Luciferin-luciferase assay was used to determine the amount of ATP release. HPDL cells were treated with different levels of mechanical stress ranging from 0 to 2.5 g/cm<sup>2</sup> and the amount of ATP released was measured (A). Maximum extracellular ATP level was observed when a 2.5 g/cm<sup>2</sup> stress was applied, therefore, this loading force was used in all later experiments. (B) The amount of ATP released from HPDL cells was measured from 1 min to 2 hrs after a 2.5 g/cm<sup>2</sup> stress treatment. The results show mechanical stress could induce ATP release in a dose and time dependent manner. The maximum extracellular ATP level was observed when a 2.5 g/cm<sup>2</sup> stress was applied for 5 mins. The results are expressed as mean  $\pm$  SD from three separate experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

ในการทดลองแรก เป็นการตรวจผลของแรงกดเชิงกลในการปล่อย ATP ออกจากเซลล์เอ็นอีโดปริทันต์ โดยการกระตุ้นเซลล์ด้วยแรงกดเชิงกล จาก 0 ถึง 2.5 กรัม/ตารางเซนติเมตร และวัดการปล่อย ATP ที่เวลา 2 ชั่วโมงหลังได้รับแรง ซึ่งจะเห็นว่า การปล่อย ATP จะเพิ่มมากที่สุดที่แรง 2.5 กรัม/ตารางเซนติเมตร จากนั้น เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยแรง 2.5 กรัม/ตารางเซนติเมตร และวัดการปล่อย ATP ที่เวลาต่างๆ พบว่า ATP ถูกปล่อยออกมาตั้งแต่ที่เวลา 1 นาที และสูงสุดที่เวลา 5 นาที จากนั้นการ

ปล่อย ATP จะลดลง จนหลัง 60 นาทีจึงเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ซึ่งน่าจะสะท้อนว่า การปล่อย ATP ครั้งแรก น่าจะปล่อยออกมาจาก ส่วนที่เก็บอยู่ใน เซลล์ ซึ่งมีรายงานว่ามียอยู่ในระดับที่สูง จากนั้นจึงมีการสร้างใหม่ และปล่อยออกมาในช่วงที่สอง หาก แรงกด ยังคงอยู่

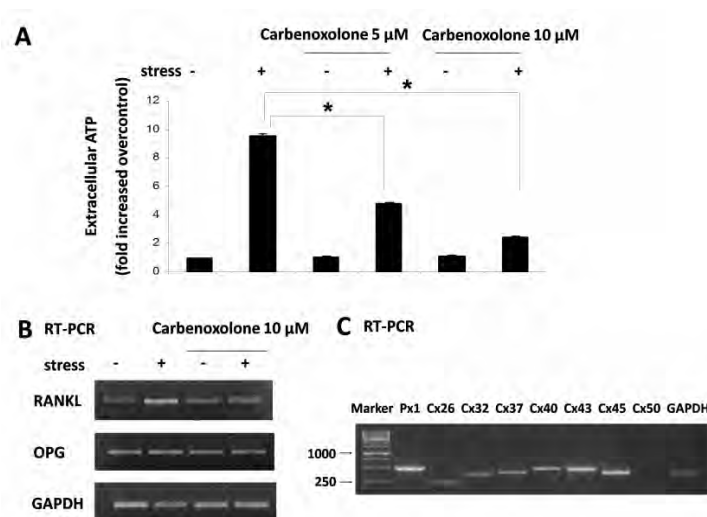


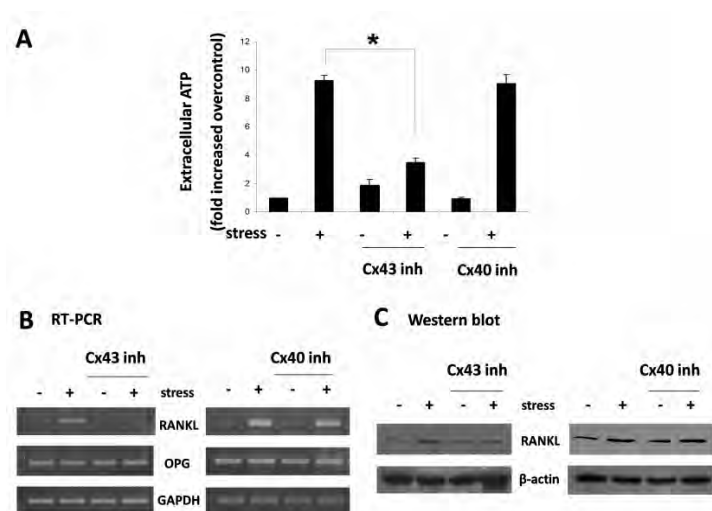
Fig. 2 The release of ATP was attenuated by a gap junction inhibitor.

Mechanical stress ( $2.5 \text{ g/cm}^2$ ) was applied on cultured HPDL cells for 5 min and 2 hrs to induce ATP release (A) and RANKL upregulation (B) respectively, in the presence or absence of a gap junction inhibitor carbenoxolone. The inhibitor was added 30 min prior to stress application. Carbenoxolone could attenuate the effect of mechanical stress on ATP release (A) and RANKL upregulation as judged by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (B). (C) reveals the expression of gap junction proteins including connexin 26, 32, 37, 40, 43, 45, and pannexin-1 in HPDL cells by RT-PCR. RANKL; receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, OPG; osteoprotegerin, GAPDH; glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, Cx; connexin, Px; pannexin. Results are expressed as mean  $\pm$  SD from three individual experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

ในการทดลองถัดมา เซลล์จะถูกเลี้ยงในสภาวะที่มี Carbenoxolone ซึ่งเป็น gap junction inhibitor ก่อนจะได้รับแรงกด ผลการทดลองพบว่า เมื่อยับยั้งการทำงานของ gap junction ระดับการปล่อย ATP จะลดลง แสดงว่า การปล่อย ATP สัมพันธ์กับการทำงานของ gap junction และผลของการลดการปล่อย ATP นี้ ยังสอดคล้องกับผลการทดลอง ที่พบว่า carbenoxolone ลดผลของแรงกดในการเหนี่ยวนำการ แสดงออกของ RANKL ด้วย

ในรูปที่ 2C แสดงชนิดของ gap junction ที่พบการแสดงออกในเซลล์เอ็นโดทีเลียส โดยตรวจพบการแสดงออกของ connexin-26, 32, 37, 40, 43, 45 และ panexin-1 แต่เนื่องจากเซลล์เอ็นโดทีเลียสมีลักษณะคล้ายเซลล์ fibroblast ทั่วไป

ดังนั้น การทำงานของ gap junction โปรตีนเหล่านี้ ไม่น่าจะทำงานในลักษณะที่ เชื่อมเซลล์สองตัวเข้าด้วยกัน แต่ น่าจะเป็น ช่องติดต่อระหว่างเซลล์กับ extracellular matrix หรือทำงานแบบ hemichannel junction



**Fig. 3** Mechanical stress-induced ATP release and RANKL upregulation was strongly inhibited by a Cx43 inhibitor. Mechanical stress ( $2.5 \text{ g/cm}^2$ ) was applied on cultured HPDL cells in the presence or absence of  $20 \mu\text{M}$  meclofenamic acid sodium salt (Cx43 inhibitor) or  $100 \mu\text{M}$  spermine (Cx40 inhibitor). Inhibitors were added 30 min prior to stress application. Culture medium was collected after 5 min and ATP was measured using a Luciferin-luciferase assay. RNA and protein were extracted after 2 hrs and 4 hrs stress application, respectively. Results showed the Cx43 inhibitor, but not the inhibitor, could inhibit mechanical stress-induced ATP release (A) and upregulation of RANKL, but not OPG, at both mRNA (B) and protein level (C). RANKL; receptor activator of nuclear factor  $\kappa\text{B}$  ligand, OPG; osteoprotegerin, GAPDH; glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. Results are expressed as mean  $\pm$  SD from three individual experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

เพื่อตรวจสอบว่ามีความจำเพาะของ hemichannel ที่เกี่ยวข้องกับการปล่อย ATP หรือไม่ เซลล์จะถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีตัวยับยั้งเฉพาะของ Cx40 และ 43 จากนั้นจึงกระตุ้นด้วยแรงกดเชิงกล ผลการทดลองในรูปที่ 3 แสดงว่า เฉพาะตัวยับยั้งต่อ Cx43 เท่านั้น ที่สามารถยับยั้งการปล่อย ATP ได้ สอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 3B และ 3C ที่แสดงว่า Cx43 สามารถยับยั้งผลของแรงกดเชิงกลในการกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL ทั้งในระดับ RNA และระดับโปรตีนตามลำดับ

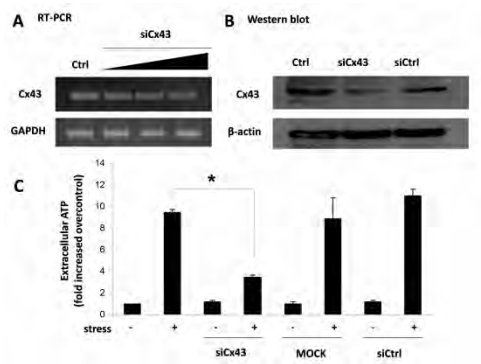


Fig. 4 Knockdown of Cx43 suppressed the inductive effect of mechanical stress on ATP release.

A and B show the mRNA and protein levels of Cx43 in HPDL cells respectively, after transfection with Cx43 small interfering (si) RNA. Graph in C indicates Cx43 siRNA transfection inhibited the inductive effect of mechanical stress-induced ATP release while the control siRNA (siCtrl) and the addition of transfection reagent alone (MOCK) had no effect. The results support a role for Cx43 in ATP release. Results are expressed as mean  $\pm$  SD from three individual experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ของ Cx43 กับการตอบสนองต่อแรงกดเชิงกลและการปล่อย ATP เซลล์จะถูกกวดการแสดงออกของ Cx43 โดยเทคนิค siRNA ดังแสดงในรูปที่ 4 ผลการทดลองในรูป A และ B แสดงว่า siRNA ที่เติมลงไป มีผลในการลดระดับการแสดงออกของ Cx43 mRNA และโปรตีน ตามลำดับ และผลในรูปที่ 4C แสดงว่า เซลล์ที่ได้รับ siRNA ของ Cx43 ลดการตอบสนองต่อแรงกดเชิงกลโดยการปล่อย ATP ในขณะที่ siControl และ transfection reagent (Mock) ไม่มีผล

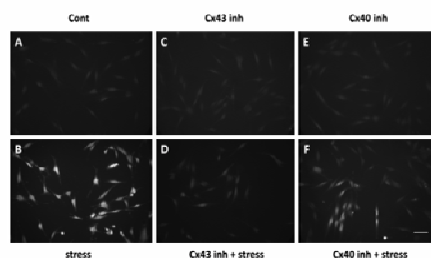


Fig. 5 Mechanical stress induced opening of Cx43-hemichannels in HPDL cells.

HPDL cells were incubated with 5 mM 5(6)-carboxyfluorescein prior to treatment with  $2.5 \text{ g/cm}^2$  of mechanical stress for 5 min. Meclofenamic acid sodium salt (Cx43 inhibitor) or spermine (Cx40 inhibitor) was added 30 min prior to stress application. Cultures were washed with PBS and Tyrode's solution, and observed under a fluorescent microscope. The presence of fluorescence signal indicated the influx of carboxyfluorescein into the cells after stress application (A-B). Addition of Cx43 (C-D) and Cx40 (E-F) inhibitors reduced the fluorescence signal in HPDL cells receiving mechanical stress. By fluorescent analysis, the Cx43 inhibitor appears to be more effective than the Cx40 inhibitor. Scale bar =  $50 \mu\text{m}$ .

รูปที่ 5 แสดงภาพฟลูออเรสเซนซ์ของเซลล์เอ็นดอทีลียัลปริทันต์ เมื่อเติมสารเรืองแสง carboxyfluorescein ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และกระตุ้นด้วยแรงกดเชิงกล ในรูป A จะเห็นว่า ในสภาวะปกติ สารเรืองแสง จะไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ แต่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยแรงกด จะพบสารเรืองแสงปรากฏภายในเซลล์ สันนิษฐานว่า แรงกดเปิด hemichannel และสารเหล่านี้ผ่านเข้าสู่เซลล์ทาง hemichannel

เพื่อพิสูจน์สมมติฐาน เซลล์จะถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีตัวยับยั้งต่อ Cx40 (E, F) และ Cx43 (C,D) จากนั้นจึงเติมสารเรืองแสง และกระตุ้นด้วยแรงกดเชิงกล ผลการทดลองพบว่า ทั้ง Cx40 และ CX43 สามารถยับยั้งการผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ โดยผลของ Cx43 จะชัดเจนกว่า และเป็นไปได้ว่า CX43 อาจจะทำหน้าที่หลักในการควบคุมการผ่านของสารเข้าออกจากเซลล์

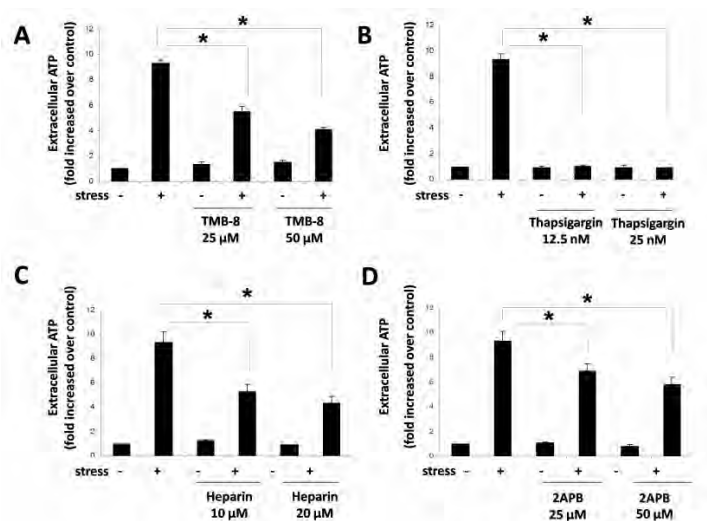


Fig. 6 The mechanism of ATP release depend on intracellular calcium signaling.

HPDL cells were pre-treated with the intracellular calcium inhibitor TMB-8 (A), thapsigargin (B), IP3 inhibitors heparin (C) and 2-APB (D) for 30 min prior to mechanical stress application. All inhibitors could significantly inhibit ATP release induced by mechanical stress. Results are expressed as mean  $\pm$  SD from three individual experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

มีรายงานที่แสดงว่า การเปิดปิดของ hemichannel ส่วนหนึ่งสัมพันธ์กับระดับของแคลเซียมในเซลล์ เพื่อตรวจสอบในประเด็นนี้ เซลล์เอ็นดอทีลียัลปริทันต์ถูกกระตุ้นด้วยสารยับยั้งต่อแคลเซียมภายในเซลล์หลายชนิด ก่อนการกระตุ้นด้วยแรงกดเชิงกล

ผลการทดลองในรูปที่ 6 แสดงว่า สารยับยั้งการเพิ่มระดับแคลเซียมในเซลล์ 2 ชนิด คือ TMB-8 และ thapsigargin รวมทั้งสารยับยั้งการทำงานของ IP3 receptor ซึ่งเป็น receptor ที่เกี่ยวข้องกับ การปล่อยแคลเซียมจาก internal store อีก 2

ชนิด คือ heparin และ 2APB สามารถยับยั้งผลของแรงกดเชิงกลในการปล่อย ATP ออกจากเซลล์ได้ สนับสนุนว่า การเปิด hemichannel เกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับแคลเซียมภายในเซลล์

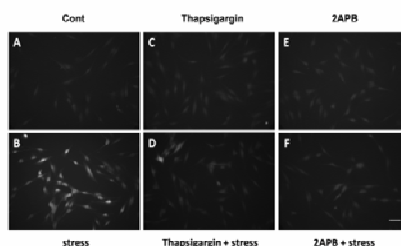


Fig. 7 Blockage of carboxyfluorescein influx by thapsigargin and 2APB.

HPDL cells were incubated with thapsigargin or 2APB for 30 min prior to 5 min mechanical stress application. The addition of carboxyfluorescein resulted in the influx of fluorescence into the cells after stress application (A-B). The presence of thapsigargin and 2APB inhibited the uptake of carboxyfluorescein (C-F), indicating the role of an  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway and IP3 receptor in stress-induced hemichannel opening. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

เพื่อตรวจสอบผลในรูปที่ 6 เซลล์เอ็นดอทีเลียลจะถูกกระตุ้นด้วยแรงกดเชิงกล ในภาวะที่เติม carboxyfluorescein และสารยับยั้ง thapsigargin (C,D) และ 2APB (E,F) ผลการศึกษาในรูปที่ 7 พบว่า สารยับยั้งทั้งสองชนิด สามารถยับยั้ง การเปิด hemichannel โดยแรงกดเชิงกล (เปรียบเทียบรูป B, D และ F) ได้ สนับสนุนว่ากระบวนการเปิด hemichannel ต้องการการเพิ่มระดับแคลเซียมภายในเซลล์

### สรุปและวิจารณ์ผล

ผลการศึกษาครั้งนี้ สนับสนุนว่าเซลล์เอ็นดอทีเลียล สามารถรับรู้ต่อแรงกดที่เกิดขึ้นได้โดยตรง โดยผลของแรงกดจะกระตุ้นการเปิด hemichannel เพื่อหลั่ง ATP จากนั้นสัญญาณจาก ATP จะเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการละลายตัวของกระดูกเบาฟัน

ในกระดูก เป็นที่ยอมรับกันว่า เซลล์กระดูก หรือ osteocytes จะรับรู้ต่อการไหลเวียนของ tissue fluid ภายใน canaliculi โดยพบว่าความแรงของการไหลเวียนจะมีผลต่อโครงสร้างของเส้นใยภายใน canaliculi ที่ยึดโยงอยู่กับ cell membrane ของ process ของ osteocytes ทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงของ membrane และถ่ายทอดแรงเข้าสู่เซลล์ (Wang et

al., 2007) ซึ่งโดยสมมติฐานนี้ การตอบสนองของเซลล์กระดูกน่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ actin cytoskeleton ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตาม การรับรู้ต่อแรง อาจเกิดจาก cell surface receptor จำเพาะที่รับรู้ต่อแรงเฉือนบนผิวเซลล์ ที่เรียกว่า mechanoreceptor ซึ่งยังไม่มี ความชัดเจน รวมทั้งกลไกการตอบสนองต่อแรงในเซลล์อื่น ๆ รวมทั้งเซลล์เอ็นดอทีลียัลนั้น ยังไม่มีความชัดเจน

ประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจเซลล์เอ็นดอทีลียัลนั้น มีรูปร่างลักษณะเป็นเซลล์ในกลุ่ม fibroblast ซึ่งเซลล์ในกลุ่มนี้ จะไม่สามารถสัมผัสกับเซลล์ข้างเคียง ต่างกับเซลล์ epithelium หรือ เซลล์กระดูก (ที่เชื่อมโยงระหว่างเซลล์ผ่านทาง cytoplasmic process) ซึ่งจะมีการติดต่อระหว่างเซลล์ผ่านทาง gap junction โดย gap junction จะประกอบขึ้นจากโครงสร้างที่เรียกว่า connexon ของเซลล์หนึ่ง ต่อเชื่อมกับ connexon บนผิวเซลล์ข้างเคียง กลายเป็นช่องทางเชื่อมเซลล์ทั้งสองเข้าด้วยกัน แต่เซลล์เอ็นดอทีลียัลนั้น ก็มีการแสดงออกของโปรตีน connexin ซึ่งเป็นโปรตีนพื้นฐานที่มาประกอบเป็น connexon หลายชนิด โดยมีรายงานว่า connexon บนเซลล์บางชนิดสามารถทำงานได้แบบ hemichannel และทำหน้าที่เชื่อมโยงติดต่อระหว่างเซลล์ และ extracellular space ซึ่งการทดลองนี้ ให้ผลสรุปในลักษณะเดียวกัน คือ เซลล์เอ็นดอทีลียัลนั้น น่าจะมี โครงสร้างของ hemichannel ที่สามารถทำงานเชื่อมโยงระหว่างเซลล์กับ extracellular environment ได้

นอกจากนี้ การที่ แรงกดเชิงกล สามารถกระตุ้นการหลั่ง ATP ได้ภายในนาทีแรก น่าจะเป็นการหลั่งจากแหล่งสะสมภายในเซลล์ ผลการทดลองยังแสดงว่า หลังจากผ่านไป 30 นาทีระดับของการหลั่ง ATP จะเริ่มลดลง และจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งที่เวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งน่าจะเป็น ATP ที่สร้างขึ้นใหม่ รายละเอียดในส่วนนี้ จะต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ผลของ ATP จะกระตุ้นการทำงานของ cell surface receptor ในกลุ่ม P2 receptor ซึ่งสามารถส่งสัญญาณจากผิวเซลล์เข้าสู่นิวเคลียส โดยการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ATP สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการละลายตัวของกระดูกอย่างน้อย 2 ยีน คือ OPN และ RANKL โดยผลของแรงกดในการกระตุ้น OPN สอดคล้องกับการที่ OPN promoter มีลำดับของนิวคลีโอไทด์ ที่ตอบสนองต่อ stress (SRE; stress responsive element) (Fujihara et al., 2006) อย่างไรก็ตาม การที่ ATP สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ OPN โดยตรง ยังไม่ชัดเจนว่าสัมพันธ์กับการทำงานของ SRE อย่างไร ในขณะที่ผลต่อ RANKL จะเป็น secondary effect คือเกิดจากการที่ ATP กระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ cyclooxygenase II (COX II) และเพิ่มการหลั่ง prostaglandin E2 (PGE2) จากนั้น PGE2 จึงจะกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL ผ่านทาง EP2 receptor



ต่อไป ดังจะเห็นได้จากการที่ ผลของแรงกดเชิงกลที่มีต่อการแสดงออกของ RANKL สามารถยับยั้งได้ด้วย indomethacin ซึ่งเป็นยาที่ยับยั้งการทำงานของ COX II ในการสังเคราะห์ PGE

OPN เป็น phosphoprotein ที่พบได้มากในกระดูก โปรตีนตัวนี้ ทำหน้าที่ส่งเสริมการเกาะของเซลล์ทำลายกระดูก หรือ osteoclast กับผิวกระดูก โดยมีรายงานว่า ในหนูที่ไม่มีการแสดงออกของ OPN จะไม่มีการละลายตัวของกระดูก ในสภาวะที่ไม่มีแรงกระทำต่อกระดูก คือไม่พบการละลายตัวของกระดูกที่ไม่มีการใช้งาน (Ishijima et al., 2001; 2002) ซึ่งแสดงถึงความสำคัญของ OPN ในกระบวนการ mechanical stress induced bone remodeling สอดคล้องกับการที่แรงกดเชิงกลสามารถเพิ่มการแสดงออกของ OPN ได้อย่างเร็ว ข้อสังเกตอีกประการหนึ่งคือ ระดับของ ATP ที่กระตุ้นการแสดงออกของ OPN นั้น อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าที่ใช้กระตุ้น RANKL กว่า 10 เท่า ซึ่งแสดงว่า OPN น่าจะเป็น primary target ของแรงกดเชิงกล

ในส่วนของ RANKL นั้น จะเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับ RANK บนผิวเซลล์ osteoclast และทำหน้าที่ส่งสัญญาณกระตุ้น differentiation, activation และ survival ของ osteoclast (reviewed in Takahashi et al., 1999; Boyle et al., 2003) โปรตีนตัวนี้ จะทำงานคู่กับ osteoprotegerin หรือ OPG ซึ่งจะแย่งจับกับ RANKL ทำให้ไม่สามารถจับกับ RANK ได้ ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ RANKL/OPG ratio จึงแสดงถึงการเพิ่มขึ้นของปริมาณ และ activity ของเซลล์ทำลายกระดูก

กลไกการตอบสนองของเซลล์เอ็นดอทีลียันต์ต่อแรงกดเชิงกลยังคงไม่ชัดเจน ผลการทดลองแสดงว่า การตอบสนองของเซลล์ต่อแรงกดเชิงกล น่าจะเกี่ยวกับการเพิ่มระดับของแคลเซียมอิออนภายในเซลล์ โดยพบว่าตัวยับยั้งการทำงานของ IP3 receptor และตัวยับยั้งการเพิ่มระดับแคลเซียมในเซลล์ สามารถยับยั้งผลของแรงกดเชิงกลในการกระตุ้น OPN และ RANKL ได้ อย่างไรก็ตาม กลไกการกระตุ้นการเพิ่มระดับแคลเซียมอิออนภายในเซลล์โดยแรงกดเชิงกลยังไม่มีคำตอบชัดเจน

การเพิ่มระดับของแคลเซียมอิออนภายในเซลล์ยังเกี่ยวข้องกับการเปิด hemichannel ด้วย ทั้งนี้ พบว่า แรงกดเชิงกลจะสามารถกระตุ้นให้สารฟลูออเรสเซนต์ ผ่านเข้าสู่เซลล์ และยับยั้งได้ด้วย ตัวยับยั้งต่อ Cx43 และตัวยับยั้งแคลเซียมอิออน เป็นที่น่าสังเกตว่า ตัวยับยั้งต่อ connexin บางชนิด เช่น Cx40 ไม่สามารถยับยั้งผลของแรงกดเชิงกลได้ ซึ่งน่าจะเป็นไปได้ว่า Cx แต่ละชนิดน่าจะมีหน้าที่และการตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่แตกต่างกัน บทบาทของ Cx ชนิดอื่นๆ ในเซลล์เอ็นดอทีลียันต์ ยังไม่มีความชัดเจน และต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

โดยสรุป ผลการศึกษาครั้งนี้ สนับสนุนว่า เซลล์เอ็นดอทีลียัลเป็นเซลล์ที่รับรู้ต่อแรงกดเชิงกลได้โดยตรง การตอบสนองต่อแรงกดเชิงกลส่วนหนึ่ง คือการปล่อย ATP จากเซลล์ จากนั้น ATP จะสามารถกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ผ่านทาง P2 receptor การตอบสนองที่เกิดขึ้น จะสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ OPN และ COX II ผลของการเพิ่ม OPN น่าจะช่วยกระตุ้นให้เซลล์ทำลายกระดูกเคลื่อนเข้ามาที่บริเวณนั้นๆ เพิ่มขึ้น ในขณะที่ การเพิ่มของ COX II จะเพิ่มการสร้างและหลั่ง PGE2 ซึ่งมีผลกระตุ้นการตอบสนองจากเซลล์ได้ในหลายด้านด้วยกัน โดยเฉพาะการกระตุ้นการแสดงออกของ RANKL และนำไปสู่การเพิ่มปริมาณ และเพิ่มการทำงานของ เซลล์ทำลายกระดูก ผลการทดลองนี้ จะช่วยเพิ่มความเข้าใจการตอบสนองของเซลล์เอ็นดอทีลียัล ต่อแรงกดเชิงกล และยังช่วยเพิ่มความเข้าใจในกระบวนการทำลายกระดูกเข้าพื้น

#### เอกสารอ้างอิง

- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337-42.
- Buckley KA, Hipskind RA, Gartland A, Bowler WB, Gallagher JA. Adenosine triphosphate stimulates human osteoclast activity via upregulation of osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *Bone*. 2002;31:582-90.
- Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol*. 2004;240:31-304.
- Chaulet H, Desgranges C, Renault MA, Dupuch F, Ezan G, Peiretti F, Loirand G, Pacaud P, Gadeau AP. Extracellular nucleotides induce arterial smooth muscle cell migration via osteopontin. *Circ Res*. 2001;89:772-8.
- Chellaiah MA, Kizer N, Biswas R, Alvarez U, Strauss-Schoenberger J, Rifas L, Rittling SR, Denhardt DT, Hruska KA. Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell* 2003;14:173-89.
- Evans CE, Mylchreest S, Andrew JG. Age of donor alters the effect of cyclic hydrostatic pressure on production by macrophages and osteoblasts of sRANKL, OPG and RANK. *BMC Musculo Dis* 2006;7:21-31.
- Fujihara S, Yokozeki M, Oba Y, Higashibata Y, Nomura S, Moriyama K. Function and regulation of osteopontin in response to mechanical stress. *J Bone Miner Res*. 2006 Jun;21(6):956-64.
- Furuya K, Sokabe M, Furuya S. Characteristics of subepithelial fibroblasts as a mechano-sensor in the intestine: cell-shape-dependent ATP release and P2Y1 signaling. *J Cell Sci*. 2005;118:3289-304.

- Hoebertz A, Arnett TR, Burnstock G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:290-7.
- Ihara H, Denhardt DT, Furuya K, Yamashita T, Muguruma Y, Tsuji K, Hruska KA, Higashio K, Enomoto S, Nifuji A, Rittling SR, Noda M. Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J Biol Chem.* 2001;276:13065-71.
- Ishijima M, Rittling SR, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin. *J Exp Med.* 2001 Feb 5;193(3):399-404.
- Ishijima M, Tsuji K, Rittling SR, Yamashita T, Kurosawa H, Denhardt DT, Nifuji A, Noda M. Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res.* 2002 Apr;17(4):661-7.
- Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002;17:210-20.
- Kawamura H, Yokote K, Asami S, Kobayashi K, Fujimoto M, Maezawa Y, Saito Y, Mori S. High glucose-induced upregulation of osteopontin is mediated via Rho/Rho kinase pathway in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Feb;24(2):276-81.
- Kawase T, Okuda K, Yoshie H. Extracellular ATP and ATPgammaS suppress the proliferation of human periodontal ligament cells by different mechanisms. *J Periodontol.* 2007;78:748-56.
- Nakano H, Furuya K, Furuya S, Yamagishi S. Involvement of P2-purinergic receptors in intracellular Ca<sup>2+</sup> responses and the contraction of mammary myoepithelial cells. *Pflugers Arch.* 1997;435:1-8.
- Schwiebert EM. Extracellular ATP-mediated propagation of Ca(2+) waves. Focus on "mechanical strain-induced Ca(2+) waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation". *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279:C281-3.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.
- Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Mar 24;256(3):449-55.

- Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M, Sato M, Kawahata H, Inaguma N, Kitamura Y, Nomura S. Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res.* 1999;14:839-49.
- Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. Isolation of novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:137-42.
- Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci.* 1998;3:346-55.
- Wang L, Jacobsen SE, Bengtsson A, Erlinge D. P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells. *BMC Immunol.* 2004;5:16.
- Wang Y, McNamara LM, Schaffler MB, Weinbaum S. A model for the role of integrins in flow induced mechanotransduction in osteocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 2;104(40):15941-6.
- Wongkhantee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P. Mechanical stress induces osteopontin expression in human periodontal ligament cells through rho kinase. *J Periodontol.* 2007 ;78:1113-9.
- Yamaguchi M, Aihara N, Kojima T, Kasai K. RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. *J Dent Res* 2006;85:751-6.
- Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Ando J. Fluid shear stress activates Ca(2+) influx into human endothelial cells via P2X4 purinoceptors. *Circ Res.* 2000;87:385-91.

## Output ที่ได้จากโครงการ

### Publication

1. Wongkhantee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P. *Mechanical Stress Induces Osteopontin via ATP/P2Y1 in Periodontal Cells*, **Journal of Dental Research**, 2008;87:564-568.
2. Luckprom P, Wongkhantee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P. *Adenosine triphosphate stimulates RANKL expression through P2Y1 receptor–cyclo-oxygenase dependent pathway in human periodontal ligament cells*. **Journal of Periodontal Research** 2010;45:404–411.
3. Luckprom P, Kanjanamekanant K, Pavasant P. *Role of Connexin43-hemichannel in stress-induced ATP release in HPDL cells*. **Journal of Periodontal Research** Accepted

### Conferences

4. Sakornwimon N, Rujirachotiawat A, Pavasant P. *Prostaglandin E2 induces receptor activator of nuclear factor kappa B ligand expression in human periodontal ligament cells via EP2 receptor*. **Abstract** presented at FDI Annual World Dental Congress meeting (Salvador Da Bahia, 2-5 September 2010).



**ได้รับรางวัล FDI best poster award**

5. Luckprom P, Kanjanamekanant K, Yongchaitrakul T, Pavasant P. *Role of Connexin43-hemichannel in stress-induced ATP release in HPDL cells*. **Abstract** presented at the 89<sup>th</sup> IADR General Session and Exhibition (San Diego, California, 17-19 March 2011)
6. Kanjanamekanant K, Pavasant P. *Mechanical stress-induced IL1 $\beta$  release in HPDL cells via Pannexin1/P2X7R*. **Abstract** presented at the 89<sup>th</sup> IADR General Session and Exhibition (San Diego, California, 17-19 March 2011)  
(เป็น abstract ที่ได้รับรางวัล Hatton awards ในการประชุม IADR ระดับภูมิภาค SEA (South East Asia) และได้เป็นตัวแทนภูมิภาค เพื่อเข้าประกวดในการประชุมใหญ่ของ IADR)

**ภาคผนวก**

Reprint 1 Journal of Dental Research 2008

Reprint 2 Journal of Periodontal Research 2010

Accepted manuscript Journal of Periodontal Research

### บทความสำหรับเผยแพร่

เนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ หมายถึงเนื้อเยื่ออ่อนที่เชื่อมระหว่างรากฟันและกระดูกเบ้าฟัน โดยนอกจากหน้าที่ในการยึดฟันไว้กับกระดูกเบ้าฟันแล้ว เนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ ยังทำหน้าที่เหมือนเบาะที่รองรับแรงที่เกิดขึ้นกับฟัน ทั้งแรงจากการบดเคี้ยว การพูด รวมทั้งแรงจากการจัดฟัน เนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ จะสร้างขึ้นโดยเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อ โดยเซลล์เหล่านี้ ทำหน้าที่สร้างเส้นใยที่ยึดโยงระหว่างรากฟันและกระดูกเบ้าฟัน และรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อปริทันต์ นอกจากนี้ยังรับรู้และตอบสนองต่อสิ่งเร้าต่างๆ ซึ่งมีผลต่อการทำลายและซ่อมแซมเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ด้วย

โดยที่เนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์เป็นเนื้อเยื่อที่ต้องรองรับแรงอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นแรง จึงน่าจะเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์เหล่านี้ การศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของแรงกดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ โดยผลการศึกษาพบว่าเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ รับรู้และตอบสนองต่อแรงกดได้ โดยแรงกดในระดับสูง สามารถเพิ่มการสร้างและการแสดงออกของยีนอย่างน้อย 2 ตัว คือ ออสติโอพอนทิน และ แรงค์ไลแกน (รีเซปเตอร์ แอคทิเวเตอร์ ออฟ นิวเคลียร์แฟกเตอร์ แคปบาปี ไลแกน) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สัมพันธ์กับการทำลายกระดูก โดย ออสติโอพอนทิน จะส่งเสริมการเคลื่อนที่และการยึดเกาะของเซลล์ทำลายกระดูก ในขณะที่แรงค์ไลแกน จะส่งเสริมการเกิดและกระตุ้นการทำงานของเซลล์ทำลายกระดูก ดังนั้น การที่เนื้อเยื่อได้รับแรงที่มากเกินไป จะกระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ และเป็นผลให้เนื้อเยื่อปริทันต์ ในบริเวณนั้น มีจำนวนของเซลล์ทำลายกระดูกที่พร้อมจะทำงานมากขึ้น และนำไปสู่การทำลายกระดูกเบ้าฟัน

การศึกษานี้ ยังพบว่ากลไกที่แรงกดเพิ่มการสร้าง ออสติโอพอนทินและแรงค์ไลแกน จะเกิดจากการที่แรงกดไปกระตุ้นการเพิ่มปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ ซึ่งจะมีผลในการกระตุ้นให้ช่องที่ผิวเซลล์ที่เรียกว่า เฮมิแชนแนล เปิดออก และมีการปล่อย สาร เอทีพี ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานภายในเซลล์ ออกจากเซลล์ ผลการศึกษานี้ แสดงว่า สาร เอทีพี นี้ นอกจากจะเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานภายในเซลล์แล้ว ยังสามารถทำหน้าที่กระตุ้นให้เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ สร้าง ออสติโอพอนทิน และ แรงค์ไลแกน ผ่านทางตัวรับ ชื่อว่า พี2วาย บนผิวเซลล์ด้วย ผลของการกระตุ้นตัวรับ พี2วาย1 จะเหนี่ยวนำการแสดงออกของออสติโอพอนทิน และกระตุ้นการสร้าง สารที่ชื่อว่า พรอสตาแกลนดิน อี2 ซึ่งปกติจะทำหน้าที่

เกี่ยวข้องกับการอักเสบ จากนั้น พรอสตาแกลนดิน อี2 จึงกระตุ้นการสร้าง แรงคไลแกนอีกทอดหนึ่ง ผลของแรงกด และ เอทีพี ในการเพิ่มการสร้างพรอสตาแกลนดิน ยังอาจทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อด้วย ซึ่งจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

โดยสรุป เซลล์เอ็นดอทีเลียล สามารถรับรู้และตอบสนองต่อแรงกดได้โดยตรง และเนื่องจากเซลล์เหล่านี้ ต้องสัมผัสกับแรงอยู่ตลอดเวลา แรงจึงน่าจะเป็นปัจจัยที่ควบคุมการทำงานของเซลล์เอ็นดอทีเลียล อย่างไรก็ดี การตอบสนองของเซลล์เอ็นดอทีเลียลต่อแรงในระดับต่ำจะยังไม่ชัดเจน แต่การศึกษาค้างนี้ พบว่าแรงในระดับที่สูง จะกระตุ้นการสร้างโปรตีน ออสติโอพอนทิน และ แรงคไลแกน ผ่านทางการหลั่ง เอทีพี การเพิ่มขึ้นของโปรตีนทั้งสองนี้ น่าจะนำไปสู่การเพิ่มปริมาณ เซลล์ทำลายกระดูก และการเพิ่มการทำลายกระดูกเข้าฟัน ผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของสมดุลแรงในการควบคุมสมดุลของเนื้อเยื่อเอ็นดอทีเลียล



S. Wongkhantee, T. Yongchaitrakul,  
and P. Pavasant\*

Department of Anatomy and Graduate School of Oral  
Biology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University,  
Henri Dunant Road, Pathumwan, Bangkok 10330,  
Thailand; \*corresponding author, prasit215@gmail.com

*J Dent Res* 87(6):564-568, 2008

## ABSTRACT

Our previous study showed that mechanical stress induced the expression of osteopontin (OPN) in human periodontal ligament (HPDL) cells through the Rho kinase pathway. The increase of OPN expression *via* Rho kinase has been demonstrated to be triggered by nucleotide. Therefore, we hypothesized that nucleotides, particularly adenosine triphosphate (ATP), participated in the stress-induced OPN expression in HPDL cells. In the present study, the roles of ATP and P2Y1 purinoceptor were examined. Reverse-transcription polymerase chain-reaction and Western blot analysis revealed that the stress-induced ATP exerted its stimulatory effect on OPN expression. The inductive effect was attenuated by apyrase and completely inhibited by the Rho kinase inhibitor, as well as by the P2Y1 antagonist. We here propose that stress induces release of ATP, which in turn mediates Rho kinase activation through the P2Y1 receptor, resulting in the up-regulation of OPN. Stress-induced ATP could play a significant role in alveolar bone resorption.

**KEY WORDS:** ATP, P2Y, osteopontin, stress.

# Mechanical Stress Induces Osteopontin *via* ATP/P2Y1 in Periodontal Cells

## INTRODUCTION

Human periodontal ligament (HPDL) cells are responsible for the mechanical stress transduced from the tooth, which is significant during periodontal tissue remodeling and repair (Lekic and McCulloch, 1996). Excessive mechanical stress can induce bone loss through the elevation of inflammatory cytokines (Ren *et al.*, 2002; Yamaguchi and Kasai, 2005) and imbalance of the receptor activator of nuclear kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) (Kanzaki *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2006). It has been demonstrated that mechanical stress also induces the expression of osteopontin (OPN) (Wongkhantee *et al.*, 2007).

The molecular mechanism of OPN induction by mechanical stress in HPDL cells is still unclear. Several reports demonstrated an increase of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) after stress application in both osteoblasts and HPDL cells (Kanzaki *et al.*, 2002; Rawlinson *et al.*, 2000; Kapur *et al.*, 2003). In addition, activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) by stress has been reported (You *et al.*, 2001). However, using inhibitors, we have indicated that Rho kinase, but neither PGE<sub>2</sub> nor MAPK, was involved in the stress-induced OPN in HPDL cells (Wongkhantee *et al.*, 2007).

In the present study, the molecules involved in the stimulation of OPN expression were further investigated. The involvement of Rho kinase in the regulation of OPN expression has been reported in smooth-muscle cells (Chaulet *et al.*, 2001; Kawamura *et al.*, 2004). Induction of OPN was observed when smooth-muscle cells were activated with nucleotides, or when high glucose levels occurred *via* Rho kinase, suggesting the role of nucleotides in OPN expression. Among the nucleotides, adenosine triphosphate (ATP) has been recognized as an important and ubiquitous intracellular and extracellular messenger in various kinds of tissues (Brambilla and Abbracchio, 2001; Burnstock and Knight, 2004; Smith and Scott, 2006). Intracellular ATP is converted into cAMP by adenylyl cyclase and acts as a major signaling molecule responsible for several biological responses, while extracellular ATP mediates its action through the family of P2 purinoceptors. The P2 purinoceptor is classified into 2 main subfamilies: P2Y, a G-protein coupled receptor; and P2X, an ion channel receptor. At least 8 subtypes of P2Y and 7 subtypes of P2X have been identified (Schwiebert, 2000).

It has been demonstrated that mechanical stress induced a rise in intracellular cAMP and the release of ATP in several cell types, including osteoblasts (Harell *et al.*, 1977; Nakano *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2000; Romanello *et al.*, 2001; Furuya *et al.*, 2005). The released ATP works as an autocrine and paracrine mediator, and plays a role in mechano-transduction. In addition, ATP has a potent stimulatory action on IL-6 secretion, but an inhibitory action on OPG expression (Ihara *et al.*, 2005). ATP also stimulates human osteoclast activity *via* the up-regulation of RANKL (Buckley *et al.*, 2002). This evidence emphasizes the important role of ATP

Received November 12, 2007; Last revision February 6,  
2008; Accepted February 12, 2008

as one of the regulators of bone homeostasis.

A recent study reported that ATP caused growth arrest in HPDL cells, suggesting the influence of ATP in periodontal tissue regeneration (Kawase *et al.*, 2007). In the present study, we found that HPDL cells expressed P2Y receptors, leading to the hypothesis that these receptors may be significant for the responses of cells to mechanical stress. We thus hypothesized that the up-regulation of OPN expression induced by mechanical stress was caused by the release of ATP, which acted through P2 receptors in HPDL cells.

## MATERIALS & METHODS

### Cell Culture

HPDL cells were obtained from healthy third molars extracted for orthodontic reasons and prepared as previously described (Pattamapun *et al.*, 2003). The protocol was approved by The Ethics Committee, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, and informed consent was obtained from each person. Briefly, teeth were rinsed with sterile phosphate-buffered saline, and the PDL was removed from the middle third of the root. The explants were harvested on 60-mm culture dishes and grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone, Logan, UT, USA), supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone), 2 mM L-glutamine (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA), 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco BRL), and 5 µg/mL amphotericin B (Gibco BRL) in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO<sub>2</sub>, at 37°C. Cells from the third to the fifth passages were used. All experiments were performed in triplicate with cells prepared from three different donors.

### Application of Mechanical Stress

The method for mechanical stress application was modified from Kanzaki *et al.* (2002). Briefly, cells were seeded in six-well plates at a density of 200,000 cells/well for 16 hrs. A plastic cylinder containing metal coins was placed over the culture to generate compressive forces ranging from 0 to 2 g/cm<sup>2</sup>.

For inhibitory experiments, each inhibitor was added to the medium 30 min prior to the experiment. The inhibitors used included 15 µM suramin, 0.18 µM NF449, 1 unit/mL apyrase, 0.5–5 µM MRS2179 (all from Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA), and 1.25 nM Rho-kinase inhibitor (Calbiochem, EMD Biosciences, San Diego, CA, USA).

### Application of ATP

Exogenous ATP (0.1, 1, 10 µM) (Sigma-Aldrich) was applied to HPDL cell culture for 2 hrs before total RNA extraction and for 24 hrs before protein extraction. RNA extraction and semi-quantitative transcription polymerase chain-reaction assay (RT-PCR) were performed. Total cellular RNA was extracted (Tri-reagent, Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) according to the manufacturer's instructions. One microgram of each RNA sample was converted to cDNA by the use of an avian myeloblastosis virus (AMV) for 1.5 hrs at 42°C. After RT, PCR was performed. The primers were prepared following the reported sequences from GenBank. The oligonucleotide sequences of the primers were: GAPDH (NM002046.3), forward 5'-TGAAGTCCGAGTCAACGGAT-3', reverse 5'-TCACACCCATGACGAACATGG-3'; OPN (NM000582.2), forward 5'-AGTACCCTGATGCTACAGACG-3', reverse 5'-CAACCAGCATATCTTCATGGC-3'; P2Y1 (NM002563.2),

forward 5'-CGGTCCGGGTTCGTCC-3', reverse 5'-CGGACCCCGGTACCT-3'; and P2Y2 (NM002564.2), forward 5'-CTAAAGCCAGCCTACGGGAC-3', reverse 5'-TCCTATCCTCTGCATGTC-3'.

The PCR was performed with Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) and a PCR volume of 25 µL. The amplification profile for OPN was 1 cycle at 94°C for 1 min, 30 cycles at 94°C for 1 min, hybridization at 60°C for 1 min., and extension at 72°C for 2 min, followed by 1 extension cycle at 72°C for 10 min. The same profile was also used for P2Y1, P2Y2 (35 cycles), and GAPDH (22 cycles). The PCR was performed in a DNA thermal cycler (Biometra, Göttingen, Germany). The amplified DNA was subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide fluorostaining. The relative intensities of the bands were measured by image analysis.

### Protein Extraction and Western Blot Analysis

Protein was extracted with a radioimmunoprecipitation assay (RIPA). Protein concentrations were measured by means of a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein samples were subjected to electrophoresis on a 10% SDS-polyacrylamide gel and subsequently transferred onto nitrocellulose membrane. For the reduction of non-specific binding, the membrane was incubated in 5% non-fat milk for 2 hrs. Subsequently, the membrane was incubated with primary antibody against OPN (1:1000; Chemicon International, Temecula, CA, USA), P2Y1 or P2Y2 (1:300; Abcam, Cambridge, MA, USA), or β-actin (1:1000; Chemicon International). The membranes were then incubated with biotinylated secondary antibody, followed by peroxidase-labeled streptavidin. The signal was captured by chemoluminescence (Pierce Biotechnology). The relative intensity of bands was measured by Scion image analysis software (Scion, Frederick, MD, USA).

### Luciferin-Luciferase bioluminescence assay

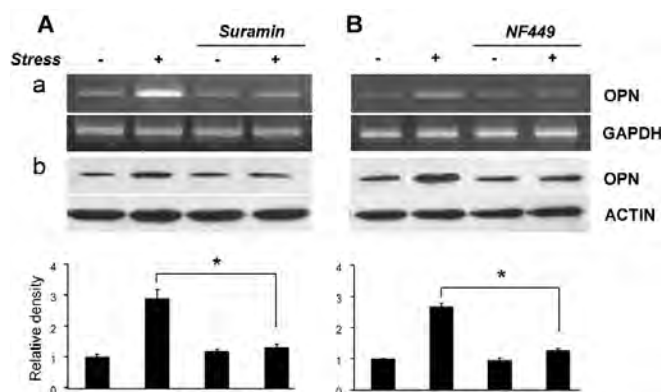
The extracellular ATP concentration was determined by means of an ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection kit for ATP measurement (Promega, Madison, WI, USA). During analysis, a 100-µL quantity of Enliten Luciferase/Luciferin (L/L) medium (rL/L reagent, reconstitution buffer) was added to 100 µL of sample in the microplate. The resulting light signal was immediately measured by a luminometer (Victor Light Luminescence Counter, PerkinElmer Ltd., Salem, MA, USA). A calibration curve was generated for each luciferase assay by serial dilution of an ATP standard.

### Statistical Analysis

All data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with the use of statistical software (SPSS, Chicago, IL, USA). A Scheffé's test was used for *post hoc* analysis ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS

HPDL cells were activated with mechanical stress (1.5 g/cm<sup>2</sup>) for 24 hrs. The results showed that stress induced the up-regulation of OPN at both mRNA (Fig. 1A) and protein levels (Fig. 1B). The inductive effect was inhibited by suramin, an antagonist for the P2 receptor family (Fig. 1A), and NF449, an antagonist for P2X1, P2X3, P2Y1, and P2Y2 (Fig. 1B). These results led to the hypothesis that nucleotide receptors, especially P2X1, P2X3, P2Y1, and P2Y2, were involved in the induction of OPN. The band density from Western blot analysis was assessed (Fig. 1).



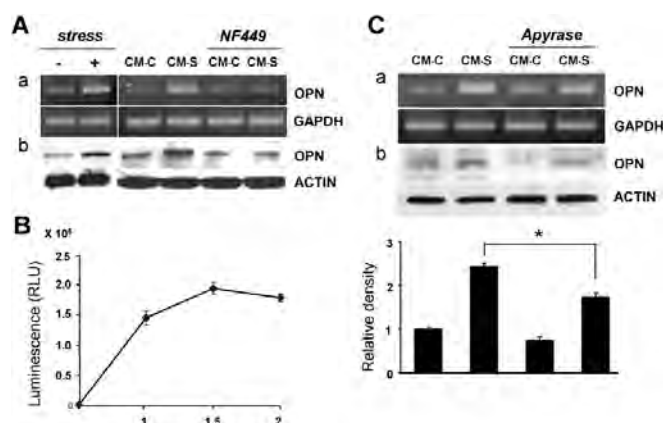
**Figure 1.** Stress-induced OPN expression was inhibited by suramin and NF449. HPDL cells were stimulated with 1.5 g/cm<sup>2</sup> of force for 24 hrs. Increased OPN mRNA (a) and protein (b) expression was observed. The stress-induced OPN expression was significantly abolished by both suramin (A) and NF449 (B). The graph represents the band density from Western blot analysis. The results are expressed as mean  $\pm$  SD from 3 different experiments. \* $p < 0.05$ .

For further analysis of the involvement of nucleotide, the conditioned medium was collected from the culture after application of stress (stress-induced conditioned medium; CM-S) for 2 hrs, transferred to another set of cultures, and culture continued for 24 hrs. The results revealed that the culture incubated with the stress-induced conditioned medium increased OPN expression when compared with that incubated with control conditioned medium (CM-C, Fig. 2A). The results suggested an effect of the secreted molecule(s) from stress-treated cultures in OPN induction.

We further examined the amount of ATP in the culture medium and found that stress increased ATP secretion into the medium (Fig. 2B). The application of apyrase, an ecto-ATPase, could partially inhibit the inductive effect of stress-induced conditioned medium. The data supported the hypothesis that ATP in the stress-induced conditioned medium had a significant effect on OPN induction (Fig. 2C).

Since ATP exerted its effect through the P2 receptor, we investigated the expression of the P2 receptor in HPDL cells. The results indicated that both P2Y1 and P2Y2 receptors were expressed in HPDL cells (Fig. 3A). However, we could not detect the expression of P2X1 and P2X3 receptors (data not shown). To elucidate the kinds of P2Y receptors involved in stress-induced OPN expression, we used MRS2179, a specific P2Y1 antagonist. The results showed that MRS2179 inhibited stress-induced OPN expression in a dose-dependent manner, indicating a role for the P2Y1 receptor (Fig. 3B).

To confirm the role of ATP, we applied exogenous ATP (0, 0.1, 1, and 10  $\mu$ M) to the cultures. We found that ATP induced the expression of OPN in a dose-dependent manner (Fig. 4A). In addition, the inductive effect of ATP was abolished by the Rho kinase inhibitor (Fig. 4B), a result similar to that obtained from mechanical stress application. However, the Rho kinase inhibitor had no effect on the stress-induced release of ATP (Fig. 4C). These results suggested that Rho kinase was involved in the stress/ATP-induced OPN expression, but not in the stress-induced ATP.



**Figure 2.** The conditioned medium (CM-S) induced the expression of OPN. (A) Cells were incubated for 24 hrs with the medium transferred from the stress-stimulated (CM-S) and non-stimulated (CM-C) cultures. CM-S induced OPN expression when compared with control (CM-C). The inductive effect exerted by CM-S was similar to that resulting from stress (S) and could be inhibited by NF449. (B) The Luciferin-Luciferase bioluminescence assay revealed that the amount of ATP in the medium collected from stress-stimulated cultures (1, 1.5, 2 g/cm<sup>2</sup>) was increased. (C) Apyrase partially inhibited the CM-S-induced OPN expression. The graph shows the band density from Western blot analysis. The results are expressed as mean  $\pm$  SD from 3 separate experiments. \* $p < 0.05$ ; a, mRNA expression; b, protein expression.

## DISCUSSION

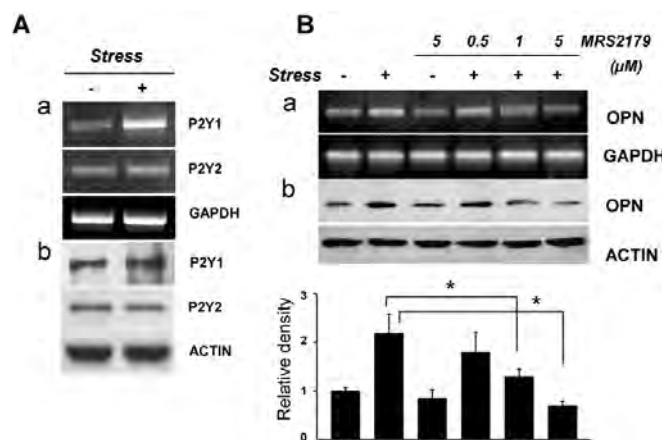
We previously reported that mechanical stress induced OPN expression in HPDL cells (Wongkhantee *et al.*, 2007). In this study, we further demonstrated that the increased expression of OPN was mediated by the release of ATP, which exerted its stimulatory effect through P2Y1 receptors.

An increase in the release of ATP in response to mechanical stress has been shown in several cell types, such as subepithelial fibroblasts (Furuya *et al.*, 2005), chondrocytes (Graff *et al.*, 2000), and osteoblasts (Homolya *et al.*, 2000; Romanello *et al.*, 2001). In the present study, we showed that HPDL cells are able to release ATP in response to mechanical stress. However, the exact mechanism of stress-induced ATP release requires further investigation.

This is the first report showing that ATP induces osteopontin expression. Our previous study showed that mechanical-stress-induced OPN occurred *via* the Rho kinase pathway. The Rho kinase inhibitor could inhibit the action of ATP-induced OPN, but not the stress-induced ATP release. These findings suggest that stress induces the release of ATP, which in turn mediates Rho kinase activation and results in the up-regulation of OPN. The function of ATP in the conditioned medium was confirmed by apyrase, a potent ecto-ATPase for ATP degradation. However, the incomplete inhibition exerted by apyrase on the conditioned medium-induced OPN expression suggests that there might be other molecule(s) involved in the mechanism, such as other nucleoside triphosphates and diphosphates, which exert their action through the P2Y1 receptor.

We found that HPDL cells expressed both P2Y1 and P2Y2 receptors. Although ATP is able to act through almost all subtypes of P2 receptors (Hoeberz *et al.*, 2003), MRS2179, the





**Figure 3.** HPDL cells expressed P2Y1 and P2Y2 ATP receptors. (A) HPDL cells expressed P2Y1 and P2Y2 receptors detectable at both mRNA and protein levels. (B) MRS2179, a specific P2Y1 antagonist, exerted an inhibitory effect on the stress-induced OPN expression in a dose-dependent manner. The graph represents the mean  $\pm$  SD of the band density from Western blot analysis. The data are from 3 separate experiments. \* $p < 0.05$ ; a, mRNA expression; b, protein expression.

specific P2Y1 receptor, could completely inhibit the action of stress-induced OPN. This result indicated that P2Y1 is the main receptor involved in the induction of OPN.

The stimulatory effect of ATP on the expression of OPN could affect the homeostasis of the periodontium. OPN has been shown to facilitate migration and adhesion of osteoclasts (Denhardt and Guo, 1993; Terai *et al.*, 1999). OPN null mice exhibited the lack of bone remodeling (Hoebertz *et al.*, 2000). It is possible that the ATP released from HPDL cells influences the behavior of both osteoblasts and osteoclasts, which express P2 receptors, since ATP can potentially enhance the activation and formation of osteoclasts (Morrison *et al.*, 1998) and stimulates cell proliferation in osteoblasts (Orriss *et al.*, 2006). Therefore, the ATP released by HPDL cells may influence the behavior of both PDL and bone cells and subsequently affect the homeostasis of the periodontium.

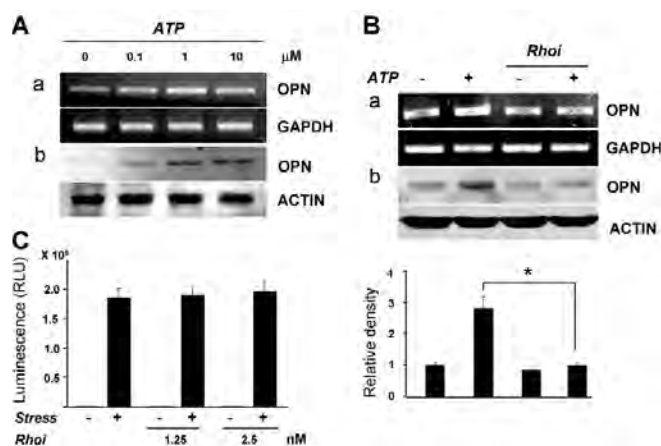
In conclusion, the present study shows that mechanical stress induces OPN expression via ATP, which mediates the signal through the P2Y1 receptor in HPDL cells. We propose that the increased ATP plays an important role in the mechanism of pressure-induced alveolar bone resorption.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and by the Ratchadaphisek Somphot Endowment for Research and the Research Unit, Chulalongkorn University.

## REFERENCES

- Brambilla R, Abbracchio MP (2001). Modulation of cyclooxygenase-2 and brain reactive astrogliosis by purinergic P2 receptors. *Ann NY Acad Sci* 939:54-62.
- Buckley KA, Hipskind RA, Gartland A, Bowler WB, Gallagher JA (2002). Adenosine triphosphate stimulates human osteoclast activity via upregulation of osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *Bone* 31:582-590.
- Burnstock G, Knight GE (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240:31-304.



**Figure 4.** ATP induced the up-regulation of OPN via Rho kinase. (A) HPDL cells were incubated with exogenous ATP (0.1, 1, and 10  $\mu$ M) for 24 hrs. The results showed that ATP stimulated the expression of OPN in a dose-dependent manner. Cells were incubated with Rho kinase inhibitor (Rhoi) for 30 min before the application of ATP (1  $\mu$ M) or stress (1.5 g/cm<sup>2</sup>) for 24 hrs. The results demonstrated that the increase in OPN expression (B), but not that of ATP (C), induced by stress was abolished by Rhoi. The graph in (B) represents the band density from Western blot analysis. The results are expressed as mean  $\pm$  SD from 3 separate experiments. \* $p < 0.05$ ; a, mRNA expression; b, protein expression.

- Chaulet H, Desgranges C, Renault MA, Dupuch F, Ezan G, Peiretti F, *et al.* (2001). Extracellular nucleotides induce arterial smooth muscle cell migration via osteopontin. *Circ Res* 89:772-778.
- Denhardt DT, Guo X (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7:1475-1482.
- Furuya K, Sokabe M, Furuya S (2005). Characteristics of subepithelial fibroblasts as a mechano-sensor in the intestine: cell-shape-dependent ATP release and P2Y1 signaling. *J Cell Sci* 118(Pt 15):3289-3304.
- Graff RD, Lazarowski ER, Banes AJ, Lee GM (2000). ATP release by mechanically loaded porcine chondrons in pellet culture. *Arthritis Rheum* 43:1571-1579.
- Harell A, Dekel S, Binderman I (1977). Biochemical effect of mechanical stress on cultured bone cells. *Calcif Tissue Res* 22:202-207.
- Hoebertz A, Townsend-Nicholson A, Glass R, Burnstock G, Arnett TR (2000). Expression of P2 receptors in bone and cultured bone cells. *Bone* 27:503-510.
- Hoebertz A, Arnett TR, Burnstock G (2003). Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci* 24:290-297.
- Homolya L, Steinberg TH, Boucher RC (2000). Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia. *J Cell Biol* 150:1349-1360.
- Ihara H, Hirukawa K, Goto S, Togari A (2005). ATP-stimulated interleukin-6 synthesis through P2Y receptors on human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 326:329-334.
- Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H (2002). Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res* 17:210-220.
- Kapur S, Baylink DJ, Lau KH (2003). Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. *Bone* 32:241-251.
- Kawamura H, Yokote K, Asaumi S, Kobayashi K, Fujimoto M, Maezawa Y, *et al.* (2004). High glucose-induced upregulation of osteopontin is mediated via Rho/Rho kinase pathway in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:276-281.
- Kawase T, Okuda K, Yoshie H (2007). Extracellular ATP and ATPgammaS suppress the proliferation of human periodontal ligament cells by

- different mechanisms. *J Periodontol* 78:748-756.
- Lekic P, McCulloch CA (1996). Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* 245:327-341.
- Morrison MS, Turin L, King BF, Burnstock G, Arnett TR (1998). ATP is a potent stimulator of the activation and formation of rodent osteoclasts. *J Physiol* 511(Pt 2):495-500.
- Nakano H, Furuya K, Furuya S, Yamagishi S (1997). Involvement of P2-purinergic receptors in intracellular Ca<sup>2+</sup> responses and the contraction of mammary myoepithelial cells. *Pflügers Arch* 435:1-8.
- Orriss IR, Knight GE, Ranasinghe S, Burnstock G, Arnett TR (2006). Osteoblast responses to nucleotides increase during differentiation. *Bone* 39:300-309.
- Pattamapun K, Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Kuwatanasuchat J, Pavasant P (2003). Activation of MMP-2 by *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res* 38:115-121.
- Rawlinson SC, Wheeler-Jones CP, Lanyon LE (2000). Arachidonic acid for loading induced prostacyclin and prostaglandin E(2) release from osteoblasts and osteocytes is derived from the activities of different forms of phospholipase A(2). *Bone* 27:241-247.
- Ren Y, Maltha JC, Van't Hof MA, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM, Zhang D (2002). Cytokine levels in crevicular fluid are less responsive to orthodontic force in adults than in juveniles. *J Clin Periodontol* 29:757-762.
- Romanello M, Pani B, Bicego M, D'Andrea P (2001). Mechanically induced ATP release from human osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289:1275-1281.
- Schwiebert EM (2000). Extracellular ATP-mediated propagation of Ca(2+) waves. Focus on "mechanical strain-induced Ca(2+) waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation". *Am J Physiol Cell Physiol* 279:281-283.
- Smith FD, Scott JD (2006). Anchored cAMP signaling: onward and upward—a short history of compartmentalized cAMP signal transduction. *Eur J Cell Biol* 85:585-592.
- Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M, Sato M, *et al.* (1999). Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res* 14:839-849.
- Wongkhantee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P (2007). Mechanical stress induces osteopontin expression in human periodontal ligament cells through rho kinase. *J Periodontol* 78:1113-1119.
- Yamaguchi M, Kasai K (2005). Inflammation in periodontal tissues in response to mechanical forces. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53:388-398.
- Yamaguchi M, Aihara N, Kojima T, Kasai K (2006). RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. *J Dent Res* 85:751-756.
- Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Ando J (2000). Fluid shear stress activates Ca(2+) influx into human endothelial cells via P2X4 purinoceptors. *Circ Res* 87:385-391.
- You J, Reilly GC, Zhen X, Yellowley CE, Chen Q, Donahue HJ, *et al.* (2001). Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biol Chem* 276:13365-13371.

# Adenosine triphosphate stimulates RANKL expression through P2Y<sub>1</sub> receptor–cyclo-oxygenase-dependent pathway in human periodontal ligament cells

P. Luckprom<sup>1</sup>, S. Wongkhantee<sup>2</sup>,  
T. Yongchaitrakul<sup>1</sup>, P. Pavasant<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand and <sup>2</sup>Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Khonkaen University, Khonkaen, Thailand

*Luckprom P, Wongkhantee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P. Adenosine triphosphate stimulates RANKL expression through P2Y<sub>1</sub> receptor–cyclo-oxygenase-dependent pathway in human periodontal ligament cells. J Periodont Res* 2010; 45: 404–411. © 2010 John Wiley & Sons A/S

**Background and Objective:** Our previous study showed that human periodontal ligament cells responded to mechanical stress by increasing adenosine triphosphate (ATP) release, accompanied by the increased expression of RANKL and osteopontin. We found that the signaling pathway of mechanical stress-induced osteopontin was mediated through ATP/P2Y<sub>1</sub> receptor and Rho kinase activation but that of mechanical stress-induced RANKL was different. In this study, we further investigated the effect of extracellular ATP on the expression of RANKL and the mechanism involved.

**Material and Methods:** Human periodontal ligament cells were treated with ATP (10–40  $\mu$ M). The expressions of RANKL and cyclo-oxygenase 2 (COX-2) were examined by RT-PCR and western blot analysis. The level of prostaglandin E<sub>2</sub> was determined using ELISA. Signaling pathways were investigated by using inhibitors and antagonist.

**Results:** Adenosine triphosphate induced the expression of RANKL. Indomethacin, an inhibitor of COX, could abolish the induction of RANKL expression, suggesting a COX-dependent mechanism. A cAMP-dependent protein kinase inhibitor, H89, and a nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate, inhibited RANKL expression, prostaglandin E<sub>2</sub> production and NF $\kappa$ B translocation. In addition, a specific P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist, MRS2179, and P2Y<sub>1</sub> small interfering RNA diminished the effect of ATP.

**Conclusion:** Extracellular ATP stimulates RANKL expression in human periodontal ligament cells through a pathway dependent on the P2Y<sub>1</sub> receptor, cAMP-dependent protein kinase, NF $\kappa$ B and COX. Our results suggest that, among the molecules responsible for the effect of mechanical stress, ATP participates in bone resorption or bone homeostasis by mediating its signal through the P2Y<sub>1</sub> receptor and the NF $\kappa$ B–COX–RANKL axis in periodontal tissue.

Prasit Pavasant, DDS, PhD, Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Henri-Dunant Road, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand  
Tel: +66 2 218 8872  
Fax: +66 2 218 8870  
e-mail: prasit215@gmail.com

**Key words:** adenosine triphosphate; cyclo-oxygenase; periodontal ligament; P2Y<sub>1</sub> receptor; receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand

Accepted for publication September 20, 2009

Adenosine triphosphate (ATP) and related nucleotides are recognized as important and ubiquitous extracellular messengers that are released from various kinds of tissues (1,2). Adenosine triphosphate is often released from different cell types in response to mechanical perturbations such as shear stress, membrane stretch or hypo-osmotic swelling (1,3–5).

Upon the mechanical stress or biological activation, ATP can be released via lytic or non-lytic mechanisms involving vesicle-mediated secretion, carrier-mediated transport or plasma membrane channels (6,7). The released ATP activates plasma membrane receptors known as purinergic (P2) receptors, which are classified broadly within two families, based on their mode of signal transduction, as the ligand-gated ion channels (P2X) and the G-protein-coupled metabotropic receptors (P2Y; 8).

Adenosine triphosphate is also one of the regulators of bone homeostasis. It has been demonstrated that ATP can stimulate osteoclast activity via an up-regulation of the expression of RANKL in osteoblasts (9). Extracellular ATP stimulated the resorptive activity of rat osteoclasts (10). Pit formation *in vitro* was observed when ATP was added to cultures of human osteoclasts isolated from a giant cell tumor (11). These lines of evidence indicate that ATP participates in bone homeostasis through the regulation of RANKL.

Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand is a molecule essential for osteoclastogenesis. It is expressed by osteoblasts as a membrane-associated factor. When RANKL binds to RANK, a receptor expressed on the cell surface of osteoclast precursors, it stimulates the differentiation of those precursors into mature osteoclasts. In contrast, an interaction of RANKL with RANK can be inhibited by osteoprotegerin, a soluble factor secreted by osteoblasts. Osteoprotegerin acts as a decoy receptor for RANKL and thus prevents osteoclast differentiation. Therefore, RANKL and osteoprotegerin are considered as major factors that regulate bone homeostasis.

It is of interest that human periodontal ligament cells also express RANKL and osteoprotegerin and that their balance could be altered by mechanical stress (12,13). Our previous study found that cells responded to mechanical stress by increasing the release of ATP, as well as the expression of RANKL and osteopontin, at both the mRNA and the protein level (14). We also reported that the mechanical stress up-regulated osteopontin via ATP/P2Y<sub>1</sub> receptor and Rho kinase activation (15). However, the elevation of RANKL expression by ATP has not been elucidated. In the present study, we hypothesized that the up-regulation of RANKL in human periodontal ligament cells was a consequence of release by ATP. The role of ATP in RANKL expression and the mechanism involved was demonstrated in human periodontal ligament cells.

## Material and methods

### Cell culture

Human periodontal ligament cells were obtained from extracted healthy third molars for orthodontic reason with informed consent. The protocol was approved by the Ethics Committee, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University. Teeth were rinsed with sterile phosphate-buffered saline, and the periodontal tissue was removed from the middle third of the root surface and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Hyclone, Logan, UT, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone), 2 mM L-glutamine (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA), 100 units/mL penicillin (Gibco BRL), 100  $\mu$ g/mL streptomycin (Gibco BRL) and 5  $\mu$ g/mL amphotericin B (Gibco BRL), and incubated in a humidified atmosphere of 95% of air, 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Each preparation was from one molar. Cells from passage 3 of three different preparations were used in the experiments.

### Treatment of cells

Cells were seeded in six-well plates, at a density of 25,000 cells cm<sup>-2</sup>, and grown to subconfluence. After depri-

vation of serum for 6 h, cells were stimulated with ATP (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, MO, USA). To examine the effect of ATP on RANKL, cyclo-oxygenase (COX) mRNA expression and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) secretion, cells were treated with 0, 10, 20 or 40  $\mu$ M ATP in serum-free medium. The RNA was extracted for RT-PCR analysis after 16 h of treatment, and the medium was collected for ELISA at 2 h after exposure to ATP. Cell protein extracts and culture medium were collected from a parallel set of cultures after 48 h of stimulation for western blot analysis. The effective dose was selected and used for the rest of the experiments.

To confirm the activity of adenylyl cyclase on RANKL expression and PGE<sub>2</sub> release, forskolin (Sigma-Aldrich Chemical) at 0.1 and 1 mg/mL was used.

### Inhibitors

The inhibitors used were 10  $\mu$ M indomethacin (Sigma-Aldrich Chemical), 20  $\mu$ M pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC; Sigma-Aldrich Chemical), 2  $\mu$ M phospholipase C inhibitor U73122, 5 nM cAMP-dependent protein kinase inhibitor H89 dihydrochloride hydrate (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 5  $\mu$ M P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist MRS2179 (Sigma-Aldrich Chemical) and small interfering RNA or control oligonucleotide (Santa Cruz Biotechnology). Cells were treated with each inhibitor for 30 min (24 h for small interfering RNA or control oligonucleotide) prior to the addition of 40  $\mu$ M ATP.

### Extraction of RNA and semi-quantitative RT-PCR

Total cellular RNA was extracted with reagent (Tri-reagent; Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) according to the manufacturer's instructions. One microgram of each RNA sample was converted to cDNA by reverse transcription using avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) for 1.5 h at 42°C. Subsequent



to reverse transcription, PCR was performed. The primers were prepared following the reported sequences from GenBank. The oligonucleotide sequences of the primers were as follows:

The PCR was performed using Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) with a PCR volume of 25  $\mu$ L. The amplification profile for RANKL (32 cycles) was one cycle at 94°C for 1 min, hybridization at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 2 min, followed by one extension cycle at 72°C for 10 min. The same profile was also used for osteoprotegerin (24 cycles), COX-1 (30 cycles), COX-2 (27 cycles) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 22 cycles). The

Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein samples were subjected to electrophoresis on a 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel and subsequently transferred onto nitrocellulose membrane. For the reduction of non-specific binding, the membrane was incubated in 5% non-fat milk for 1 h before being incubated in the primary antibody. The antibody raised against RANKL (dilution 1:50; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), osteoprotegerin (dilution 1:250; R&D Systems), P2Y<sub>1</sub> (dilution 1:300; Abcam, Cambridge, MA, USA) or actin (dilution 1:1000; Chemicon International, Temecula, CA, USA) was used as the primary antibody. The mem-

branes were incubated in biotinylated secondary antibody, followed by peroxidase-labeled streptavidin. The signal was captured by chemoluminescence. The relative intensities of bands were measured by imaging software analysis (Scion Image; Scion).

### Measurement of PGE<sub>2</sub>

Measurement of PGE<sub>2</sub> from the media was performed using PGE<sub>2</sub> ELISA kits (Parameter PGE<sub>2</sub> Immunoassay; R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. The experiments were performed in triplicate.

### Detection of nuclear factor $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) localization by immunofluorescence

Cells were seeded in a chamber slide (Lab-TEK® II Chamber slide™ System; Nalge Nunc International Corp., Rochester, NY, USA) at a density of 50,000 cells per chamber and grown to subconfluence. After being starved in serum-free conditions for 6 h, cells were treated with ATP in the presence or absence of inhibitors. At the indicated time, cells were washed in phosphate-buffered saline (for 5 min, twice) and fixed with cold methanol (Merck KGAA, Darmstadt, Germany) for

RANKL	Forward, 5' CCA GCA TCA AAA TCC CAA GT 3' Reverse, 5' CCC CTT CAG ATG ATC CTT C 3'
Osteoprotegerin	Forward, 5' TGC AGT ACG TCA AGC AGG A 3' Reverse, 5' TGA CCT CTG TGA AAA CAG C 3'
COX-1	Forward, 5' GCA GCT GAG TGG CTA TTT CC 3' Reverse, 5' ATC TCC CGA GAC TCC CTG AT 3'
COX-2	Forward, 5' TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT 3' Reverse, 5' AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT 3'
P2Y <sub>1</sub>	Forward, 5' CGG TCC GGG TTC GTC C 3' Reverse, 5' CGG ACC CCG GTA CCT 3'
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Forward, 5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT 3' Reverse, 5' TCA CAC CCA TGA CGA ACA TGG 3'

PCR was performed in the DNA thermal cycler (Biometra, Gottingen, Germany). The amplified DNA was electrophoresed on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide fluorostaining. The relative intensities of the gel bands were measured by imaging software analysis (Scion Image; Scion, Frederick, MD, USA).

### Western blot analysis

Osteoprotegerin was prepared from the culture medium. The lyophilized medium was dissolved in sample buffer, boiled and subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis to detect osteoprotegerin. To detect RANKL, P2Y<sub>1</sub> receptor and actin, protein was extracted with radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Sigma-Aldrich Chemical). Protein concentrations were measured using a protein assay kit (BCA protein assay kit; Pierce Biotechnology,

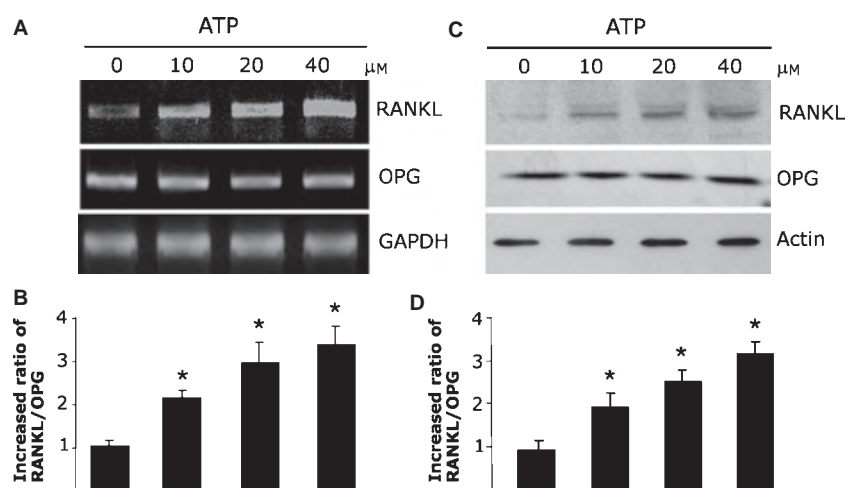


Fig. 1. Adenosine triphosphate induced RANKL mRNA and protein expression. Human periodontal ligament cells were treated with various concentrations of ATP ranging from 0 to 40  $\mu$ M for 16 h for RT-PCR and 48 h for western blot analysis in serum-free conditions. The results from both RT-PCR (A) and western blotting (C) showed that ATP increased the expression of RANKL, but not that of osteoprotegerin (OPG), in a dose-dependent manner. The graphs represent the ratio of RANKL to osteoprotegerin from RT-PCR (B) and western blot analysis (D). The results are expressed as means  $\pm$  SD from three different experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .



10 min. Cells were incubated overnight at 4°C with primary antibody against NFκB p50 (NLS; dilution 1:200 in 10% fetal bovine serum, sc-114; Santa Cruz Biotechnology), followed by biotinylated secondary antibody (dilution 1:1000; Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, USA) and streptavidin–fluorescein isothiocyanate (dilution 1:1000; Sigma-Aldrich Chemical) for 40 min. The chamber slide was then washed with phosphate-buffered saline and mounted. Cells were observed using a scanning photographic system (MIRAX MIDI, Carl Zeiss MicroImaging Inc., Jena, Germany).

### Transfection of small interfering RNA

Human periodontal ligament cells were grown in six-well plates, in medium without antibiotics, to 70–80% confluence. Cells were treated with a mixed solution of small interfering RNA oligonucleotides specific to P2Y<sub>1</sub> according to the manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology) and were transfected with the small interfering RNA for 24 h before treatment with ATP. For the control culture, control small interfering RNA was added.

### Statistical analysis

All data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using statistical software (SPSS, Chicago, IL, USA). Scheffé's test was used for *post hoc* analysis ( $p < 0.05$ ).

### Results

Our previous results indicated that an increased level of RANKL expression as well as increased ATP release was a response of human periodontal ligament cells to mechanical stimulation (14,15); the effect of ATP on RANKL expression was therefore further investigated in the present study. Human periodontal ligament cells were activated with 0, 10, 20 or 40 μM ATP, and the expressions of RANKL mRNA and protein were analyzed at 16 and 48 h, respectively. The mRNA expression of RANKL was normalized to the expression level of GAPDH,

while the amount of RANKL protein was normalized to the amount of actin. The results showed that ATP increased the expression of RANKL in a concentration-dependent manner at both transcriptional and translational levels (Fig. 1A,C). The effective concentration (40 μM) of ATP was used for the rest of the experiments. However, neither mRNA nor protein expression of osteoprotegerin was observed (Fig. 1A,C). The relative band densities of RANKL/osteoprotegerin from each experiment are depicted as histograms (Fig. 1B,D).

To determine the intracellular pathway involved in the regulation of RANKL by ATP, indomethacin was used as an inhibitor. We found that the elevation of RANKL induced by ATP was suppressed by indomethacin, a non-specific inhibitor of COX activity

(Fig. 2A,B). To confirm that ATP mediated its signal via the COX pathway, the expressions of COX-1 and COX-2 and the production of PGE<sub>2</sub> were examined after stimulating the cells with 0–40 μM ATP. The result showed that ATP increased the expression of COX-2 but not COX-1 (Fig. 2C). Production of PGE<sub>2</sub> increased remarkably at concentrations of 20 and 40 μM (Fig. 2D).

We also investigated which molecules are involved in the ATP-induced RANKL expression. Inhibitors were used to explore the signals involved. The toxicity of the inhibitors was monitored using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Pretreatment with U73122, an inhibitor of phospholipase C, resulted in neither blockade of the PGE<sub>2</sub> release nor RANKL

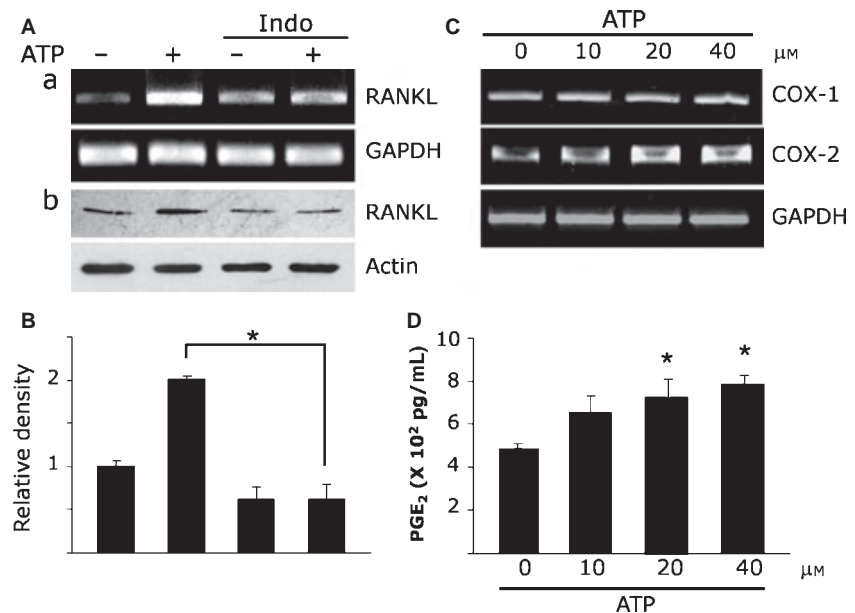


Fig. 2. Adenosine triphosphate-induced RANKL expression was inhibited by indomethacin. (A) Human periodontal ligament cells were treated with 40 μM ATP in the presence or absence of indomethacin, a non-specific COX inhibitor, to determine the role of COX in the mechanism. The inhibitor was added 30 min before the treatment. The RNA was extracted at 16 h, and the cell protein extract was collected at 48 h after the treatment. The results showed that application of indomethacin could inhibit the up-regulation of RANKL expression induced by ATP at both the mRNA (Aa) and the protein levels (Ab). The graph (B) represents the band density from western blot analysis when control as marked as 1. The results are expressed as means ± SD from three different experiments. (C) Adenosine triphosphate induced COX-2 mRNA after treatment with various concentrations of ATP. The results revealed that the expression of COX-2 increased in a concentration-dependent manner, but not COX-1. (D) The amount of PGE<sub>2</sub> in the culture medium was also measured by ELISA after 2 h of exposure to ATP. We found that ATP increased PGE<sub>2</sub> production significantly in a dose-dependent manner. The graph shows the mean ± SD of band density from three separate experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

expression in response to ATP stimulation (data not shown). In contrast, pre-incubation with either the NF $\kappa$ B inhibitor PDTC or H89 dihydrochloride hydrate, a potent inhibitor of cAMP-dependent protein kinase (PKA), inhibited the elevation of both RANKL (Fig. 3A) and PGE<sub>2</sub> (Fig. 3B), suggesting that cAMP and NF $\kappa$ B are the upstream signals of the PGE<sub>2</sub>–RANKL axis in response to ATP in human periodontal ligament cells. To confirm the involvement of cAMP, an adenylyl cyclase activator, forskolin, was used. It appeared that forskolin increased the synthesis of RANKL and increased the release of PGE<sub>2</sub> from human periodontal ligament cells (Fig. 3C,D). Immuno-fluorescent staining was also used to explore the NF $\kappa$ B nuclear translocation. The results showed that ATP induced NF $\kappa$ B translocation and the

effect was attenuated by H89 as well as by PDTC (Fig. 4).

To investigate whether P2Y<sub>1</sub> is the receptor through which ATP mediates its signal to up-regulate COX-2 and RANKL expression, a specific P2Y<sub>1</sub> antagonist, MRS2179, was applied to the cultures prior to addition of ATP. It appeared that MRS2179 inhibited the stimulatory effect of ATP on COX-2 expression (Fig. 5A) and PGE<sub>2</sub> production (Fig. 5B). In addition, the expression of RANKL mRNA and protein were attenuated (Fig. 5C,D). The results suggested that ATP could act through the P2Y<sub>1</sub> receptor.

Small interfering RNA was used as another approach to confirm the results obtained using P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist. Control small interfering RNA and P2Y<sub>1</sub> small interfering RNA (120, 140 and 180 pM) were transfected into human periodontal ligament cells for 24 h before application of ATP.

The results confirmed that P2Y<sub>1</sub> small interfering RNA reduced P2Y<sub>1</sub> mRNA and protein expression effectively at 120 pM (Fig. 6A) and that it exerted an inhibitory effect on both PGE<sub>2</sub> release (Fig. 6B) and RANKL expression (Fig. 6C,D) similar to that exerted by P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist.

## Discussion

The results revealed that extracellular ATP stimulates RANKL production through the COX-dependent pathway. In addition, the stimulatory effect is mediated through the P2Y<sub>1</sub> receptor in human periodontal ligament cells.

The role of ATP on the up-regulation of RANKL has been reported mostly in osteoblasts. Buckley *et al.* (9) demonstrated that ATP stimulated human osteoclast activity via the up-regulation of osteoblast-expressed RANKL. Jin-Man Kim and co-workers (16) also demonstrated that blocking ATP generation significantly decreases RANKL-stimulated osteoclast differentiation. However, the increase in the level of RANKL generated by ATP in human periodontal ligament cells has not been elucidated. Although our previous study showed that mechanical stress evoked RANKL expression as well as ATP secretion, the impact of ATP on RANKL expression has not been clarified. The results of this study provided a clearer picture showing that the increase of stress-induced RANKL could be a consequence of ATP release.

The involvement of COX/PGE<sub>2</sub> in the regulation of RANKL expression has been reported by Kanzaki and co-workers (12). They demonstrated that compressive force stimulated osteoclastogenesis in periodontal ligament cells by increasing the expression of RANKL and PGE<sub>2</sub> production. We considered the possibility that PGE<sub>2</sub> might be an intermediate mediator of the ATP-induced RANKL expression. The expression of COX-1 and COX-2 and the production of PGE<sub>2</sub> were examined, and the results showed that COX-2 and PGE<sub>2</sub> responded to ATP stimulation. The supporting evidence is that the stimulatory effect of ATP was

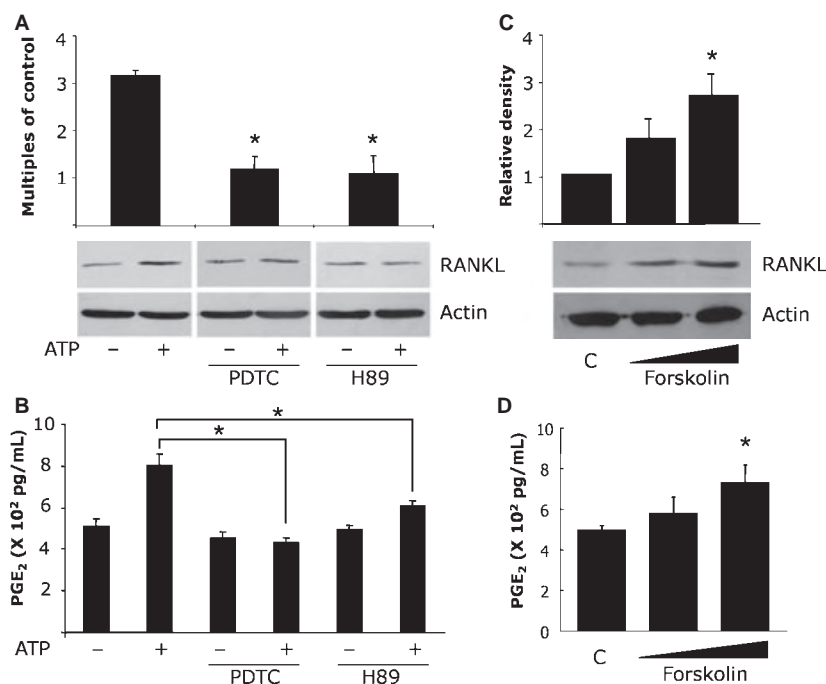


Fig. 3. The stimulatory effect of ATP was abolished by PDTC and H89. Cells were treated with PDTC, an NF $\kappa$ B inhibitor, and H89, a cAMP-dependent protein kinase inhibitor, 30 min before the addition of ATP. The protein extract was collected at 48 h for western blot analysis and the culture medium was collected at 2 h for ELISA after the treatment. The results showed that ATP-induced RANKL (A) and PGE<sub>2</sub> production (B) were inhibited by both PDTC and H89. The effects of forskolin, an activator of adenylyl cyclase, on RANKL expression and PGE<sub>2</sub> release are shown in (C) and (D), respectively. The graph (C) represents the band density from the ratio of RANKL to actin when control as marked as 1. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

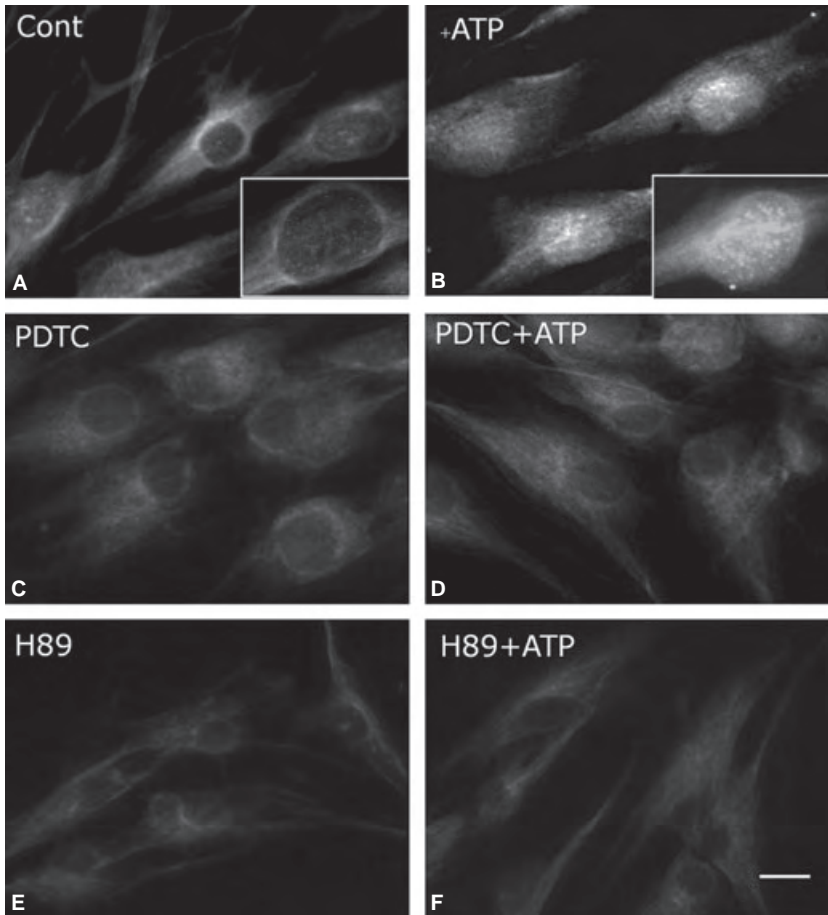


Fig. 4. Nuclear localization of NF $\kappa$ B enhanced by ATP was abolished by PDTC and H89. Human periodontal ligament cells were incubated with or without inhibitor, PDTC or H89, for 30 min before being treated with ATP for 2 h. Immunofluorescent staining showed that ATP enhanced nuclear localization of NF $\kappa$ B (B) when compared with the control treatment (A). The effect of ATP was abolished by PDTC (D) and H89 (F) when compared with their corresponding control cultures (C,E). Scale bar represents 10  $\mu$ m.

abrogated by indomethacin, an inhibitor of prostanoid synthesis. In addition, these results were consistent with previous reports demonstrating the effect of ATP on the release of PGE<sub>2</sub> in many cell types, such as endothelial cells (17), astrocytes (18) and epithelial cells (19). We conclude that, in human periodontal ligament cells, the up-regulation of RANKL by ATP is via a COX-dependent pathway.

The blocking effect exerted by NF $\kappa$ B inhibitor and PKA inhibitor on the release of PGE<sub>2</sub> and the expression of RANKL also suggests that NF $\kappa$ B and cAMP are the upstream regulators of the PGE<sub>2</sub> release. Our study indicated that ATP induced the translocation of NF $\kappa$ B and the translocation was suppressed by the inhibitor of cAMP-

dependent protein kinase. The results suggest that cAMP could be the upstream signal of NF $\kappa$ B. It is tempting to speculate that ATP induces the formation of cAMP and causes activation of NF $\kappa$ B. Subsequently, activation of NF $\kappa$ B will activate cyclo-oxygenase, resulting in the release of PGE<sub>2</sub>.

The involvement of cAMP in ATP-induced RANKL expression was further confirmed by the use of forskolin. Addition of forskolin without ATP could increase the expression of RANKL at both the mRNA and the protein level.

The finding that NF $\kappa$ B is one of the downstream targets of the P2 receptor agreed with the report by Korcok *et al.* (20), which demonstrated that nucleotides acted through P2Y<sub>6</sub> receptors to

initiate NF $\kappa$ B signaling in osteoclasts. In addition, the role of NF $\kappa$ B in controlling the release of PGE<sub>2</sub> had been reported (21). However, our data suggest that the increase of PGE<sub>2</sub> and RANKL stimulated by ATP are not a consequence of PLC activity. This finding is different from those found in other cell types including epithelial cells (19,22), which proposed that ATP-induced release of PGE<sub>2</sub> was dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup> and phospholipase C activity.

In regard to the ATP receptor, ATP is able to act through almost all subtypes of P2 receptors to exert various effects (23). It has been shown to initiate NF $\kappa$ B signaling and enhance survival through P2Y<sub>6</sub> (20) and P2X<sub>7</sub> receptors (24) in osteoclasts, to activate DNA synthesis by acting on P2X receptors in human osteoblast-like MG-63 cells (25) and to generate resorption pits on dentin disks by elevating RANKL expression in osteoblast-like UMR-106 cells, where the P2Y<sub>1</sub> receptor is predominantly expressed (9). These results indicate that locally acting ATP may play a pivotal role in osteoclast activation at bone-resorbing sites by inducing elevated expression of RANKL ligament in bone cells. For human periodontal cells, we found in the previous study that perturbing the function of the P2Y<sub>1</sub> receptor using MRS2179, a specific inhibitor of the P2Y<sub>1</sub> receptor, attenuated the inductive effect of ATP on osteopontin expression (15). In the present study, a similar blocking effect on ATP-induced RANKL expression was seen using MRS2179 as well as small interfering RNA. In addition, it is notable that interference with the function of the P2Y<sub>1</sub> receptor exerted an almost complete inhibition on the stimulatory effect of ATP, indicating that the P2Y<sub>1</sub> receptor could be the main receptor involved in the regulation of both RANKL and osteopontin expression by ATP in human periodontal ligament cells.

Since mechanical stress induces expression of PGE<sub>2</sub> (12) as well as proinflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  (26), which is able to stimulate the release of PGE<sub>2</sub>, it is possible that the release of PGE<sub>2</sub> is a

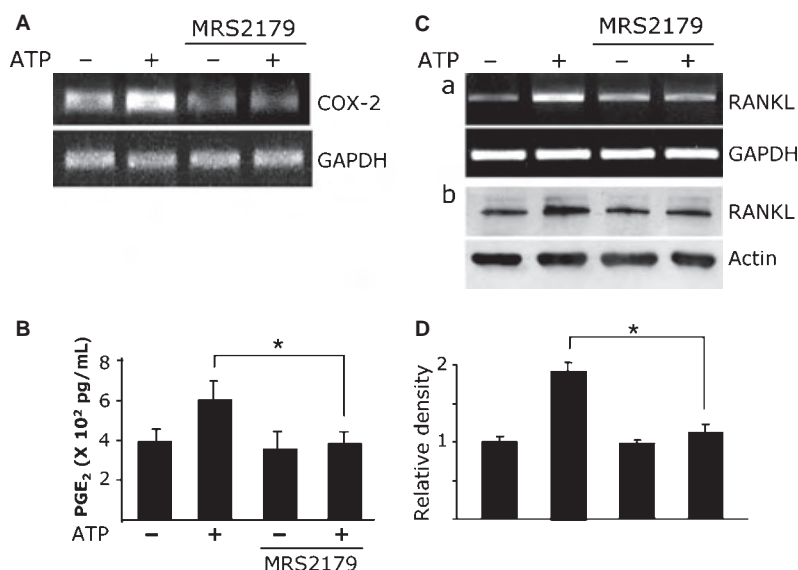


Fig. 5. The effect of MRS2179 on ATP-induced RANKL expression. Cells were pre-incubated with MRS2179, a specific P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist, for 30 min prior to addition of ATP. After 16 and 48 h of exposure to ATP, the RNA and protein extract were collected for RT-PCR and western blot analysis, respectively. The culture medium from a parallel set of experiments was collected after 2 h of treatment for ELISA. The results showed that MRS2179 exerted an inhibitory effect on the ATP-induced COX-2 expression (A) and PGE<sub>2</sub> production (B). MRS2179 attenuated the ATP-induced RANKL expression at both the mRNA (Ca) and the protein level (Cb). The graph (D) represents the band density from western blot analysis when control as marked as 1. The results are expressed as means  $\pm$  SD from three different experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

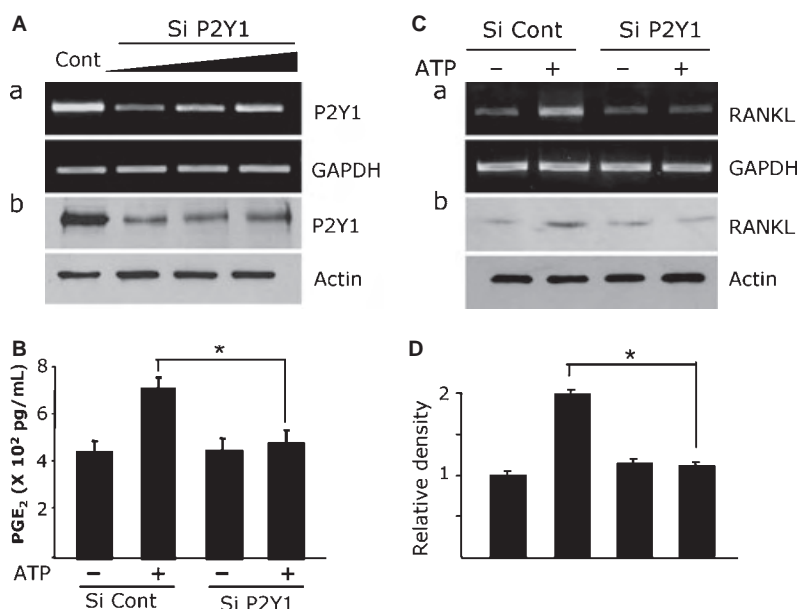


Fig. 6. Adenosine triphosphate-induced up-regulation of RANKL may involve the P2Y<sub>1</sub> receptor. Human periodontal ligament cells were transfected with P2Y<sub>1</sub> small interfering (Si) RNA. (A) The P2Y<sub>1</sub> small interfering RNA could interfere with the expression of the P2Y<sub>1</sub> receptor at both the mRNA (Aa) and the protein level (Ab). The P2Y<sub>1</sub> small interfering RNA inhibited the release of PGE<sub>2</sub> (B) as well as the expression of RANKL (C). The graph represents the band density from western blot analysis when control as marked as 1 (D). The results are expressed as means  $\pm$  SD from three different experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

result of the action of those pro-inflammatory cytokines. We demonstrated in the previous report that mechanical stress increased the level of ATP (15) and revealed in the present study that ATP could cause a rise in PGE<sub>2</sub> production within 2 h. Our results advance the understanding that, besides proinflammatory cytokines, ATP is one of the upstream signaling molecules for PGE<sub>2</sub> release in response to mechanical stress in human periodontal ligament cells and plays a role in periodontal tissue homeostasis through the P2Y<sub>1</sub> receptor.

In conclusion, extracellular ATP stimulates RANKL production by human periodontal ligament cells through P2Y<sub>1</sub> receptor-COX-PGE<sub>2</sub> pathways (Fig. 7). Adenosine triphosphate may thereby play an important physiological role in periodontal remodeling.

## Acknowledgements

This work was supported by Thailand Research Fund (TRF) grant number RSA 5180004, the 100th anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphisek Somphot Endowment for Research Chulalongkorn University) and by the Chulalongkorn University Graduate Scholarship to commemorate the 72nd anniversary of his majesty king Bhumibol Adulyadej. The authors thank Rushmore Co., Ltd for assistance with the photographic system.

## References

1. Ferguson DR, Kennedy I, Burton TJ. ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes—a possible sensory mechanism? *J Physiol* 1997;**505**:503–511.
2. Knight GE, Burnstock G. The effect of pregnancy and the oestrus cycle on purinergic and cholinergic responses of the rat urinary bladder. *Neuropharmacology* 2004;**46**:1049–1056.
3. Hazama A, Shimizu T, Ando-Akatsuka Y *et al*. Swelling-induced, CFTR-independent ATP release from a human epithelial cell line: lack of correlation with volume-sensitive cl(–) channels. *J Gen Physiol* 1999;**114**:525–533.



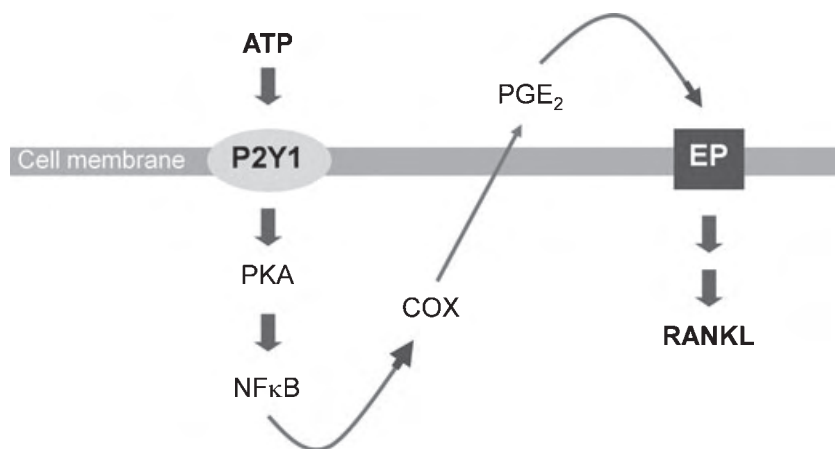


Fig. 7. Proposed model of ATP-induced RANKL expression. The schematic drawing proposes that ATP activates the P2Y<sub>1</sub> receptor in human periodontal ligament cells, which mediates its signal through protein kinase A (PKA) and nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). Activation of NF $\kappa$ B causes the release of PGE<sub>2</sub> via a COX-dependent pathway. The activation of RANKL expression is a consequence of the released PGE<sub>2</sub>, after which the cascade of signaling molecules involved requires further clarification. EP, E prostanoid receptor.

4. Grygorczyk R, Hanrahan JW. CFTR-independent ATP release from epithelial cells triggered by mechanical stimuli. *Am J Physiol* 1997;**272**:1058–1066.
5. Sabirov RZ, Dutta AK, Okada Y. Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J Gen Physiol* 2001;**118**:251–266.
6. Burrell HE, Wlodarski B, Foster BJ *et al*. Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface. *J Biol Chem* 2005;**280**:29667–29676.
7. Fitz JG. Regulation of cellular ATP release. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2007;**118**:199–208.
8. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G *et al*. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1997;**18**:79–82.
9. Buckley KA, Hipskind RA, Gartland A, Bowler WB, Gallagher JA. Adenosine triphosphate stimulates human osteoclast activity via upregulation of osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand. *Bone* 2002;**31**:582–590.
10. Morrison MS, Turin L, King BF, Burnstock G, Arnett TR. ATP is a potent stimulator of the activation and formation of rodent osteoclasts. *J Physiol* 1998;**511**:495–500.
11. Bowler WB, Littlewood-Evans A, Bilbe G, Gallagher JA, Dixon CJ. P2Y<sub>2</sub> receptors are expressed by human osteoclasts of giant cell tumor but do not mediate ATP-induced bone resorption. *Bone* 1998;**22**:195–200.
12. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand up-regulation via prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis. *J Bone Miner Res* 2002;**17**:210–220.
13. Yamaguchi M, Aihara N, Kojima T, Kasai K. RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. *J Dent Res* 2006;**85**:751–756.
14. Wongkhantee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P. Mechanical stress induces osteopontin expression in human periodontal ligament cells through rho kinase. *J Periodontol* 2007;**78**:1113–1119.
15. Wongkhantee S, Yongchaitrakul T, Pavasant P. Mechanical stress induces osteopontin via ATP/P2Y<sub>1</sub> in periodontal cells. *J Dent Res* 2008;**87**:564–568.
16. Kim JM, Jeong D, Kang HK, Jung SY, Kang SS, Min BM. Osteoclast precursors display dynamic metabolic shifts toward accelerated glucose metabolism at an early stage of RANKL-stimulated osteoclast differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2007;**20**:935–946.
17. Hashimoto N, Watanabe T, Shiratori Y *et al*. Prostanoid secretion by rat hepatic sinusoidal endothelial cells and its regulation by exogenous adenosine triphosphate. *Hepatology* 1995;**21**:1713–1718.
18. Xu J, Chalimoniuk M, Shu Y *et al*. Prostaglandin E<sub>2</sub> production in astrocytes: regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;**69**:437–448.
19. Ruan YC, Wang Z, Du JY *et al*. Regulation of smooth muscle contractility by the epithelium in rat vas deferens: role of ATP-induced release of PGE<sub>2</sub>. *J Physiol* 2008;**586**:4843–4857.
20. Korcok J, Raimundo LN, Du X, Sims SM, Dixon SJ. P2Y<sub>6</sub> nucleotide receptors activate NF- $\kappa$ B and increase survival of osteoclasts. *J Biol Chem* 2005;**280**:16909–16915.
21. Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. IL-1 $\beta$ -mediated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  via an NF $\kappa$ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 2003;**17**:2115–2117.
22. Bucheimer RE, Linden J. Purinergic regulation of epithelial transport. *J Physiol* 2004;**555**:311–321.
23. Hoebertz A, Arnett TR, Burnstock G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci* 2003;**24**:290–297.
24. Korcok J, Raimundo LN, Ke HZ, Sims SM, Dixon SJ. Extracellular nucleotides act through P2X<sub>7</sub> receptors to activate NF- $\kappa$ B in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2004;**19**:642–651.
25. Nakamura E, Uezono Y, Narusawa K *et al*. ATP activates DNA synthesis by acting on P2X receptors in human osteoblast-like MG-63 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;**279**:C510–C519.
26. Nakao K, Goto T, Gunjigake KK, Konoo T, Kobayashi S, Yamaguchi K. Intermittent force induces high RANKL expression in human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 2007;**86**:623–628.



**Role of Connexin43-hemichannel in mechanical stress-induced ATP release in human periodontal ligament cells**

Journal:	<i>Journal of Periodontal Research</i>
Manuscript ID:	JRE-12-10-1336.R2
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Luckprom, Pimporn; Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Department of Anatomy Kanjamekanant, Kavita; Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Department of Anatomy Pavasant, Prasit; Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Department of Anatomy
Keywords:	Periodontal ligament, Cytokines, Inflammatory mediator, Orthodontics

SCHOLARONE™  
Manuscripts

**Role of Connexin43-hemichannels in mechanical stress-induced ATP release in human periodontal ligament cells**

PIMPORN LUCKPROM, KAVITA KANJANAMEKANANT\*, PRASIT PAVASANT

DEPARTMENT OF ANATOMY AND GRADUATE SCHOOL OF ORAL BIOLOGY, FACULTY OF DENTISTRY, CHULALONGKORN UNIVERSITY, HENRI DUNANT ROAD, PATHUMWAN, BANGKOK 10330, THAILAND

\*AUTHOR OF CORRESPONDENCE

PRASIT PAVASANT

DEPARTMENT OF ANATOMY, FACULTY OF DENTISTRY, CHULALONGKORN UNIVERSITY, HENRI-DUNANT ROAD, PATHUMWAN, BANGKOK 10330, THAILAND

PHONE: +66-2-218-8872 FAX: +66-2-218-8870 E-MAIL: PRASIT215@GMAIL.COM

(FAX NUMBER AND E-MAIL CAN BE PUBLISHED)

GRANT SUPPORT: THAILAND RESEARCH FUND (TRF) GRANT NUMBER RSA 5180004, CHULALONGKORN UNIVERSITY CENTENARY ACADEMIC DEVELOPMENT PROJECT, 100<sup>TH</sup> ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (RATCHADAPHISEKSOMPHOT ENDOWMENT FUND), GOLDEN JUBILEE SCHOLARSHIP FROM THE THAILAND RESEARCH FUND.

NUMBER OF FIGURES: 7

NUMBER OF TABLES: 1

RUNNING TITLE: STRESS-INDUCED ATP RELEASE VIA CONNEXIN43

## Abstract

**Background and Objective:** OUR PREVIOUS STUDIES SHOWED MECHANICAL STRESS COULD INDUCE ADENOSINE TRIPHOSPHATE (ATP) RELEASE IN HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT (HPDL) CELLS. SIGNALING THROUGH P2 PURINERGIC RECEPTORS, ATP INCREASED EXPRESSION AND SECRETION OF OSTEOPONTIN (OPN) AND RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR KAPPA-B LIGAND (RANKL). IN THIS STUDY, THE MECHANISM OF STRESS-INDUCED ATP RELEASE WAS INVESTIGATED.

**Material and Methods:** CONTINUOUS COMPRESSION WAS APPLIED ON CULTURED HPDL CELLS. THE RELEASED ATP WAS MEASURED USING LUCIFERIN-LUCIFERASE BIOLUMINESCENCE. EXPRESSION OF GAP JUNCTION PROTEINS WAS EXAMINED BY REVERSE TRANSCRIPTION-PCR (RT-PCR) AND WESTERN BLOT ANALYSIS. THE OPENING OF HEMICHANNELS WAS DEMONSTRATED BY CELLULAR UPTAKE OF FLUORESCENT DYE, 5(6)-CARBOXYFLUORESCCEIN AMINE (CFDA-AM), KNOWN TO PENETRATE THROUGH HEMICHANNELS. INTRACELLULAR SIGNAL TRANSDUCTION WAS INVESTIGATED USING INHIBITORS AND ANTAGONISTS.

**Results:** MECHANICAL STRESS CAUSED THE RELEASE OF ATP INTO CULTURE MEDIUM, WHICH WAS ATTENUATED BY CARBENOXOLONE, A NONSPECIFIC GAP JUNCTION INHIBITOR. MECLOFENAMIC ACID SODIUM SALT, A CONNEXIN43 (CX43) INHIBITOR, INHIBITED ATP RELEASE UNDER MECHANICAL STRESS. KNOCKDOWN OF CX43 EXPRESSION BY SMALL INTERFERENCE RNA (siRNA) REDUCED THE AMOUNT OF MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE, SUGGESTING THE INVOLVEMENT OF HEMICHANNELS. IN ADDITION, INTRACELLULAR  $Ca^{2+}$  BLOCKERS COULD ALSO INHIBIT MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE AND THE OPENING OF GAP JUNCTION.

**Conclusion:** OUR STUDY DEMONSTRATED THE INVOLVEMENT OF GAP JUNCTION HEMICHANNELS, ESPECIALLY CX43, IN THE STRESS-INDUCED ATP RELEASE MECHANISM. FURTHERMORE, THE MECHANISM MAY BE REGULATED BY INTRACELLULAR  $Ca^{2+}$  SIGNALING PATHWAYS. THESE RESULTS SUGGEST AN IMPORTANT ROLE FOR GAP JUNCTION HEMICHANNELS IN THE FUNCTION AND BEHAVIOR OF HPDL CELLS.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Keywords:** ATP; CONNEXIN43; HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS; MECHANICAL STRESS

Manuscript proof

## Introduction

ADENOSINE TRIPHOSPHATE (ATP) IS ONE OF THE EXTRACELLULAR SIGNALING MOLECULES REGULATING VARIOUS BIOLOGICAL PROCESSES INCLUDING CELL PROLIFERATION, CELL DEATH, MUSCLE CONTRACTION AND INTERCELLULAR COMMUNICATION (1). ATP HAS A SIGNIFICANT FUNCTION IN CONTROLLING CELLULAR BEHAVIOR. FOR EXAMPLE, IT PROMOTED COLLAGEN DEPOSITION IN OSTEOBLASTS (2) WHILE IT INHIBITED CALCIFICATION (3). IT IS WELL-KNOWN THAT, IN PERIODONTAL TISSUE, THERE IS AN INFLAMMATORY MEDIATOR PLAYING IMPORTANT ROLE IN CHRONIC PERIODONTITIS. ATP CAUSED GROWTH ARREST AND MIGHT INFLUENCE PERIODONTAL TISSUE REGENERATION (4).

ADENOSINE TRIPHOSPHATE CAN BE RELEASED FROM CELLS IN RESPONSE TO VARIOUS STIMULATION SUCH AS MECHANICAL STRESS, HYPOTONICITY AND REDUCED EXTRACELLULAR MATRIX LEVEL (5-9). THE DETAILED MECHANISM OF ATP RELEASE IS STILL NOT FULLY UNDERSTOOD. SEVERAL MECHANISMS HAVE BEEN REPORTED INCLUDING VESICULAR RELEASE, ABC TRANSPORTERS, DIFFUSION VIA STRETCH-ACTIVATED CHANNELS, VOLTAGE-SENSITIVE CHANNELS AS WELL AS CONNEXIN HEMICHANNELS (10).

GAP JUNCTIONS ARE SPECIALIZED MEMBRANE STRUCTURES WHICH CONNECT THE CYTOPLASM OF TWO NEIGHBORING CELLS. THEY FUNCTION IN CELL-CELL COMMUNICATION AND THE PASSAGE OF SMALL MOLECULES SUCH AS AMINO ACIDS, IONS AND SECOND MESSENGERS. IN ADDITION, A FUNCTION OF HEMICHANNEL GAP JUNCTION ON CELL SURFACE HAS BEEN PROPOSED AS A CHANNEL CONNECTING CELL AND THE EXTRACELLULAR SPACE (11). IN GENERAL, THE STRUCTURE OF HEMICHANNEL OR NESTOR IS COMPOSED OF SIX CONNEXINS SUBUNITS JOINED TOGETHER TO FORM A NONSELECTIVE CHANNEL PERMEABLE TO MOLECULES OF LESS THAN 1000 DALTONS. ATP, WITH A MOLECULAR WEIGHT OF 507.21 DALTONS, COULD THEREFORE BE RELEASED FROM HEMICHANNELS (5, 12-14).

THE INVOLVEMENT OF HEMICHANNELS IN ATP RELEASE HAS BEEN DIRECTLY DEMONSTRATED IN SEVERAL CELL TYPES. STUDIES IN ASTROCYTES, ENDOTHELIAL CELLS, AND OSTEOCYTES SHOWED THAT THE RELEASED ATP WAS INHIBITED BY HEMICHANNEL BLOCKERS. IN ADDITION, CERTAIN TYPES OF CONNEXINS (CX) HAVE BEEN SHOWN TO BE INVOLVED IN ATP RELEASE. AMONG THESE, PANNEXIN-1 AND CONNEXIN43 (CX43) WERE REPORTED TO BE A CANDIDATE FOR A CONDUIT FOR A VARIOUS STIMULI (16-20).

CONNEXIN43 IS EXPRESSED IN MANY TISSUES INCLUDING HPDL CELLS (21-23). THE INVOLVEMENT OF CX43 IN ATP RELEASE WAS DEMONSTRATED IN RETINAL, PIGMENT EPITHELIAL, HUMAN MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS (19), POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES, CHONDROCYTES (25) AND OSTEOCYTES (26).

OUR PREVIOUS STUDY SHOWED MECHANICAL STRESS INDUCED ATP RELEASE IN HPDL CELLS. EXOGENOUS ATP SUBSEQUENTLY ACTIVATED P2 RECEPTORS, RESULTING IN INCREASED SYNTHESIS OF OPN AND RANKL. ADDITION OF SURAMIN, A P2 RECEPTOR ANTAGONIST, INHIBITED THE INDUCTION OF BOTH OPN AND RANKL BUT HAD NO EFFECT ON THE RELEASE OF ATP. THESE RESULTS INDICATED P2 RECEPTORS INVOLVED IN THE INDUCTION OF OPN AND RANKL BUT NOT PARTICIPATE IN THE FORMATION AND RELEASE OF ATP. HOWEVER, THE MECHANISM OF ATP RELEASE IN HPDL CELLS BY MECHANICAL STRESS WAS STILL UNKNOWN. IN THE PRESENT STUDY, WE AIM TO INVESTIGATE THE MECHANISM AND THE INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAY INVOLVED IN MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE IN HPDL CELLS.

**Material and methods**

**Cell culture**

HPDL CELLS WERE OBTAINED FROM HEALTHY THIRD MOLARS EXTRACTED FOR PERIODONTAL REASONS AND PREPARED AS PREVIOUSLY DESCRIBED (26). THE PROTOCOL WAS APPROVED BY THE ETHICS COMMITTEE, FACULTY OF DENTISTRY, CHULALONGKORN UNIVERSITY.

OBTAINED FROM EACH PATIENT (FOUR FEMALES AND TWO MALES; 18-22 YEARS OF AGE). AFTER RINSING WITH STERILE PHOSPHATE BUFFERED SALINE, PERIODONTAL TISSUE WAS COLLECTED FROM THE MIDDLE THIRD OF THE ROOT SURFACE AND PLACED IN CULTURE VESSELS CONTAINING MODIFIED EAGLE'S MEDIUM (HYCLONE, LOGAN, UT, USA) SUPPLEMENTED WITH 10% FETAL BOVINE SERUM (HYCLONE), 2 MM L-GLUTAMINE (GIBCO BRL, CARLSBAD, CA, USA), 100 UNIT/ML PENICILLIN (GIBCO BRL), 100  $\mu$ G/ML STREPTOMYCIN (GIBCO BRL), AND 5  $\mu$ G/ML AMPHOTERICIN B (GIBCO BRL), THEN INCUBATED IN AN ATMOSPHERE OF AIR CONTAINING 5% CO<sub>2</sub>. CELL PREPARATION WAS ESTABLISHED FROM ONE DENTITION. CELLS FROM ALL PATIENTS WERE USED. ALL EXPERIMENTS WERE PERFORMED IN TRIPLICATE USING CELLS PREPARED FROM THREE INDEPENDENT PREPARATIONS.

ALL THE OBTAINED PDL CELLS WERE CHARACTERIZED BY THE LEVEL OF ALKALINE PHOSPHATASE (ALP) ACTIVITY AND THE ABILITY TO INITIATE AN IN VITRO CALCIFICATION AFTER INCUBATION IN OSTEOGENIC CONDITION MEDIUM FOR 14-16 DAYS.

### Application of Mechanical Stress

MECHANICAL STRESS WAS APPLIED AS PREVIOUSLY DESCRIBED (27). BRIEFLY, PDL CELLS WERE SEEDDED IN SIX-WELL PLATES AT A DENSITY OF  $2.5 \times 10^5$  CELLS/CM<sup>2</sup>. A PLASTIC CYLINDER CONTAINING METAL COINS WAS PLACED OVER THE CULTURE TO GENERATE COMPRESSION. THE FORCE WAS APPLIED FROM 0 TO 2.5 G<sup>2</sup>/CM<sup>2</sup> FOR 0 TO 4 H.

### Measurement of extracellular ATP (Luciferin-luciferase bioluminescence assay)

CELLS WERE SEEDDED IN SIX-WELL PLATES AT A DENSITY OF  $2.5 \times 10^5$  CELLS/CM<sup>2</sup> AND GROWN TO APPROXIMATELY 90% CONFLUENCE. AFTER DEPRIVATION OF MECHANICAL STRESS WAS APPLIED TO THE CULTURE. FOR THE INHIBITORY EXPERIMENTS, INHIBITORS WERE ADDED BEFORE STRESS APPLICATION. CULTURE MEDIUM WAS COLLECTED FOR EXTRACELLULAR ATP MEASUREMENT.

USING A HIGHLY SENSITIVE LUCIFERASE BASED TECHNIQUE, ANALYSIS SYSTEM  
BIOLUMINESCENCE DETECTION KIT FROM AGR, MADISON, WI, USA). THE ASSAY USED  
RECOMBINANT LUCIFERASE TO CATALYZE THE FOLLOWING REACTION;  $ATP + D-LU$   
 $OXYLUCIFERIN + AMP + PPI \rightarrow CO$  LIGHT (560 NM). WHEN ATP WAS THE LIMITING  
COMPONENT IN THE LUCIFERASE REACTION, THE INTENSITY OF THE EMITTED LIGHT WAS  
ATP CONCENTRATION. MEASUREMENT OF THE LIGHT INTENSITY USING A LUMINO-METER  
LUMINESCENCE COUNTER, PERKINELMER LTD., SALEM, MA, USA) PERMITTED DIRECT  
OF ATP. A CALIBRATION CURVE WAS GENERATED FOR EACH LUCIFERASE ASSAY BY SE  
ATP STANDARD.

**Inhibitors**

FOR INHIBITORY EXPERIMENTS, INHIBITORS OR SMALL INTERFERING RNA (S  
ADDED 30 MIN BEFORE RESPECTIVELY TO STRESS APPLICATION. THE INHIBITORS USED INC  
5-10  $\mu$ M CARBENOXOLONE DISODIUM SALT (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL), 20  $\mu$ M MEC  
ACID SODIUM SALT (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL), 100  $\mu$ M SPERMINE (SIGMA-ALDRICH  
12.5-25 NM THAPSIGARGIN (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL), 25-50  $\mu$ M [3,4,5-TRIMETHOXY  
ACID 8-(DIETHYLAMINO)OCTYL ESTER]; TMB-8 (BIOMOL RESEARCH LABORATOR  
PLYMOUTH, PA, USA), 100-200  $\mu$ G/ML HEPARIN SODIUM SALT (SIGMA-ALDRICH CHEMIC  
50  $\mu$ M 2-AMINOETHOXYDIPHENYL BORATE; 2-APB (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL), AND  
OLIGONUCLEOTIDE SPECIFIC TO CX43 AND CONTROL OLIGONUCLEOTIDE (SANTA CRUZ

**Extraction of RNA and semiquantitative RT-PCR**

TOTAL CELLULAR RNA WAS EXTRACTED WITH TRI-MOL (BIOMOL RESEARCH CENTER,  
CINCINNATI, OH, USA) ACCORDING TO THE MANUFACTURER'S INSTRUCTIONS. ONE  
EACH RNA SAMPLE WAS CONVERTED TO CDNA BY REVERSE TRANSCRIPTION

MYELOBLASTOSIS VIRUS REVERSE TRANSCRIPTASE (PROMEGA, MADISON, WI, USA) FOR  
 SUBSEQUENT TO REVERSE TRANSCRIPTION, PCR WAS PERFORMED. PRIMERS WERE PREPARED  
 THE REPORTED SEQUENCES FROM GENBANK. THE OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCES ARE LISTED IN  
 TABLE 1. PCR WAS PERFORMED IN A THERMAL CYCLER (BIOMETRA, GOTTINGEN, GERMANY),  
 USING TAQ POLYMERASE (QIAGEN, HILDEN, GERMANY) WITH A PCR VOLUME OF 25 µL. THE  
 AMPLIFICATION PROFILE FOR RANKL (32 CYCLES) WAS ONE CYCLE AT 94°C FOR 30 SEC,  
 HYBRIDIZATION AT 60°C FOR 1 MIN AND EXTENSION AT 72°C FOR 2 MIN, FOLLOWED BY A  
 CYCLE AT 72°C FOR 10 MIN. THE SAME PROFILE WAS ALSO USED FOR OSTEOPROTEGERON  
 PANNEXIN1 (35 CYCLES), CX26 (35 CYCLES), CX32 (35 CYCLES), CX37 (35 CYCLES), CX38  
 (35 CYCLES), CX43 (35 CYCLES), CX45 (35 CYCLES), CX50 (35 CYCLES), AND GLYCERALDEHYDE  
 PHOSPHATE DEHYDROGENASE; GAPDH (22 CYCLES). THE AMPLIFIED DNA WAS ELECTROPHORESED  
 ON 1% AGAROSE GEL AND VISUALIZED BY ETHIDIUM BROMIDE FLUOROSTAINING.

### Western blot analysis

FOR PROTEIN DETECTION, TOTAL PROTEIN WAS EXTRACTED WITH RADIOIMMUNOPRECIPITATION  
 ASSAY (RIPA) BUFFER. PROTEIN CONCENTRATIONS WERE DETERMINED USING A PROTEIN ASSAY KIT  
 (BCA PROTEIN ASSAY KIT; PIERCE BIO-TECHNOLOGY, ROCKFORD, IL, USA). EQUAL AMOUNTS OF  
 PROTEIN SAMPLES WERE SUBJECTED TO ELECTROPHORESIS ON A 10% SODIUM DODECYL SULFATE  
 POLYACRYLAMIDE GEL AND SUBSEQUENTLY TRANSFERRED ONTO A NITROCELLULOSE MEMBRANE.  
 TO REDUCE NON-SPECIFIC BINDING, MEMBRANES WERE INCUBATED IN 5% NON-FAT MILK FOR 1 HOUR.  
 AFTER WASHING, MEMBRANES WERE INCUBATED IN PRIMARY ANTIBODY RAISED AGAINST RANKL (CLONE: 70513 DI  
 R&D SYSTEMS, MINNEAPOLIS, MN, USA), CX43 (CLONE: CX-1B1 DILUTION 1:250; INVITROGEN  
 CORPORATION), OR ACTIN (CLONE: C4 DILUTION 1:1000; THERMOFISHER SCIENTIFIC). MEMBRANES  
 WERE THEN INCUBATED IN BIOTINYLATED SECONDARY ANTIBODY, FOLLOWED BY PEROXIDASE  
 STREPTAVIDIN. THE SIGNAL WAS CAPTURED BY CHEMILUMINESCENT SUBSTRATE (ECL PLUS; GE Healthcare).

STABLE PEROXIDE SOLUTION AND SUPERFICIAL LUMINOL/ENHANCER SOLUTION, PIERCE  
BIO-TECHNOLOGY, ROCKFORD, IL, USA).

**Dye-Uptake Assay**

TRANSMEMBRANE FLUX OF LOW MOLECULAR WEIGHT DYES IS A COMMONLY USED  
ASSESSING THE PRESENCE AND FUNCTION OF CONNEXIN HEMICHANNELS. FOR A  
VERIFICATION THAT A GAP JUNCTION-LIKE CHANNEL IS INVOLVED IN ATP RELEASE,  
UPTAKE OF 5(6)-CARBOXYFLUORESCIN, A FLUORESCENT TRACER MOLECULE WITH A  
OF 376.32 DALTONS (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL), HPDL CELLS AFTER UNDERGOING MECHANICAL  
STRESS. GAP JUNCTION INHIBITORS WERE ADDED 30 MIN PRIOR TO 5 MIN MECHANICAL  
APPLICATION. CELLS WERE THEN INCUBATED IN 5 MM 5(6)-CARBOXYFLUORESCIN  
WASHED WITH PBS AND TYRODE'S SOLUTION, AND OBSERVED UNDER A FLUORESCENCE  
BACKGROUND DYE UPTAKE WAS DEFINED AS FLUORESCENCE ACHIEVED IN THE ABSENCE OF  
STRESS. IMAGES WERE ACQUIRED USING AN AXIOVERT 40CFL MICROSCOPE (CARL ZEISS).

**Transfection of small interfering RNA**

HPDL CELLS WERE GROWN IN SIX-WELL PLATES, IN MEDIUM WITHOUT ANTIBIOTICS  
80% CONFLUENCE. CELLS WERE TREATED WITH A MIXED SOLUTION OF SIRNA OLIGONUCLEOTIDES  
SPECIFIC TO CX43 ACCORDING TO THE MANUFACTURER'S INSTRUCTIONS (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)  
AND WERE TRANSFECTED WITH SIRNA BEFORE TREATMENT. FOR THE CONTROL, CELLS WERE  
TREATED WITH CONTROL SIRNA (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY).

**Statistic analysis**

ALL DATA WERE ANALYZED BY ONE-WAY ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA) USING SPSS SOFTWARE (SPSS, CHICAGO, IL, USA). SCHEFFE'S TEST WAS USED FOR POST HOC ANALYSIS ( $P < 0.05$ ).

## Results

### CARBENOXOLONE, A GAP JUNCTION INHIBITOR, ATTENUATED STRESS-INDUCED ATP RELEASE

TO STUDY THE MECHANISM OF EXTRACELLULAR ATP RELEASE IN HPDL CELLS, WE MEASURED THE EXTRACELLULAR ATP CONCENTRATION IN THE MEDIA AFTER HPDL STIMULATION BY MECHANICAL STRESS. A FORCE DEPENDENT MECHANISM OF OBSERVED (P < 0.05) (FIG.1A). A MECHANICAL STRESS LEVEL OF 0.5 WAS SELECTED FOR USE IN THE TIME COURSE EXPERIMENT OF RELEASE. AN INCREASE IN ATP WAS NOTED WITHIN 5 MIN AFTER APPLICATION. THE AMOUNT OF ATP DECREASED AFTER INCREASED AGAIN (FIG. 1B).

CARBENOXOLONE, A NON-SPECIFIC INHIBITOR OF GAP JUNCTIONS, WAS ADDED 30 MIN PRIOR TO STRESS APPLICATION IN ORDER TO INVESTIGATE THE INFLUENCE OF GAP JUNCTION IN STRESS-INDUCED-ATP RELEASE IN HPDL CELLS. THE MECHANICAL STRESS WAS APPLIED ON HPDL CELLS FOR 5 MIN IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF CARBENOXOLONE. CARBENOXOLONE SIGNIFICANTLY SUPPRESSED MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE (FIG. 2A). MOREOVER, CARBENOXOLONE INHIBITED THE UPREGULATION OF RANKL BUT NOT OPG (OPG) MRNA EXPRESSION INDUCED BY MECHANICAL STRESS (FIG. 2B). PREVIOUS RESULTS SHOWING THAT MECHANICAL STRESS INDUCES RANKL MRNA EXPRESSION THROUGH THE RELEASE OF ATP.



THE EFFECT OF CARBENOXOLONE PROMPTED US TO EXAMINE THE EXPRESSION OF  
PROTEINS IN HPDL CELLS. BY USING RT-PCR, WE OBSERVED HPDL CELLS EXPRESSED AT  
LEAST 7 GAP JUNCTION PROTEINS INCLUDING CX26, 32, 37, 40, 43, 45 AND PANNEXIN1 (FIG.3A)

CX43 IS INVOLVED IN STRESS-INDUCED ATP RELEASE IN HPDL CELLS

IN ORDER TO CLARIFY THE TYPE OF GAP JUNCTION INVOLVED IN STRESS-INDUCED ATP  
RELEASE, SPECIFIC GAP JUNCTION INHIBITORS WERE USED. SPECIFIC INHIBITORS TO CX40 AND CX43 WERE SELECTED  
BASED ON PREVIOUS REPORTS (18-20, 28). RESULTS IN FIGURE 3A INDICATED THAT CX43 INHIBITOR  
(MECLOFENAMIC ACID SODIUM SALT), BUT NOT CX40 INHIBITOR (SPERMINE), ATTENUATED STRESS-  
INDUCED ATP RELEASE. APPLICATION OF THE CX43 INHIBITOR, BUT NOT THE CX40 INHIBITOR,  
SUPPRESSED THE MECHANICAL STRESS-INDUCED RANKL mRNA AT BOTH MRNA (FIG.3B)  
AND PROTEIN LEVELS (FIG.3C), SUPPORTING THE ROLE OF CX43 IN MECHANICAL STRESS-  
INDUCED ATP RELEASE AND RANKL UPREGULATION.

THE SIGNIFICANCE OF CX43 HEMICHANNELS IN STRESS-INDUCED ATP RELEASE WAS  
INVESTIGATED BY TRANSIENT TRANSFECTION OF HPDL CELLS WITH SIRNA. CONTROL  
CX43 SIRNA WERE TRANSFECTED INTO HPDL CELLS BEFORE MECHANICAL STRESS  
APPLICATION. WE OBSERVED CX43 SIRNA EFFECTIVELY REDUCED THE LEVEL OF CX43  
(FIG.4A) AND PROTEIN EXPRESSION (FIG.4B) AS SHOWN IN FIGURE 4. DOWNREGULATION  
OF CX43 EXPRESSION BY SIRNA RESULTED IN A STRONG INHIBITION OF MECHANICAL STRESS-  
INDUCED ATP RELEASE (FIG.4C). MOCK TRANSFECTED CELLS (TRANSFECTION REAGENT ALONE)  
TRANSFECTED WITH CONTROL SIRNA SHOWED A NORMAL PATTERN OF ATP RELEASE  
UNDER MECHANICAL STRESS (FIG.4C).

MECHANICAL STRESS-INDUCED THE OPENING OF GAP JUNCTION HEMICHANNELS

DYE UPTAKE EXPERIMENTS WERE PERFORMED TO EXAMINE THE EFFECT OF MECHANICAL STRESS ON THE OPENING OF GAP JUNCTIONS. RESULTS SHOWED INCREASED CARBOXYFLUORESCCEIN UPTAKE BY HPDL CELLS AFTER MECHANICAL STRESS COMPARED TO CONTROL (FIG.5A-B). FURTHERMORE, THE INDUCTIVE EFFECT OF MECHANICAL STRESS ON THE OPENING OF HEMICHANNELS WAS SUPPRESSED BY CARBENOXOLONE (DATA NOT SHOWN) AND THAPSIGARGIN (FIG.5C-D) BUT NOT CX40 INHIBITOR (FIG.5E-F).

#### INTRACELLULAR CALCIUM PARTICIPATED IN STRESS-INDUCED ATP RELEASE

IT HAS BEEN REPORTED THAT AN INCREASE IN INTRACELLULAR CALCIUM PARTICIPATES IN THE OPENING OF HEMICHANNELS (24,29). TO TEST WHETHER INTRACELLULAR CALCIUM IS INVOLVED IN STRESS-INDUCED GAP JUNCTION OPENING, HPDL CELLS WERE INCUBATED WITH THAPSIGARGIN, WHICH INHIBITS  $Ca^{2+}$  RELEASE FROM INTRACELLULAR STORES, AND BEFORE TREATING THE CELLS WITH MECHANICAL STRESS. AS SHOWN IN FIGURE 6A, THAPSIGARGIN SUPPRESSED THE AMOUNT OF STRESS-INDUCED ATP RELEASE IN A DOSE DEPENDENT MANNER. MOREOVER, ADDITION OF THAPSIGARGIN TO INHIBITOR OF CALCIUM-ATPASE TO DEplete INTRACELLULAR  $Ca^{2+}$  SIGNIFICANTLY ABOLISH THE STRESS-INDUCED EXTRACELLULAR ATP RELEASE WHEN COMPARED TO CONTROL (FIG.6B). THESE RESULTS SUGGEST THAT INTRACELLULAR  $Ca^{2+}$  STORES ARE NECESSARY FOR ATP RELEASE.

NEXT, TWO IP3 ANTAGONISTS, HEPARIN AND 2-APB WERE USED TO EXAMINE THE ROLE OF IP3 RECEPTOR. RESULTS SHOWED BOTH HEPARIN (FIG.6C) AND 2-APB (FIG.6D) SIGNIFICANTLY DECREASED MECHANICAL STRESS-EVOKED ATP RELEASE, SUPPORTING THE ROLE OF IP3 RECEPTOR IN STRESS-INDUCED ATP RELEASE. FURTHERMORE, CARBOXYFLUORESCCEIN DYE UPTAKE WAS INCREASED BY THAPSIGARGIN AND 2APB, SUGGESTING INTRACELLULAR  $Ca^{2+}$  SIGNALING MIGHT BE THE UPSTREAM SIGNAL TO GAP JUNCTION OPENING IN HPDL CELLS.

#### **Discussion**

MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE HAS BEEN REPORTED IN SEVERAL CELL TYPES INCLUDING OSTEOBLASTS (32), SUBEPITHELIAL FIBROBLASTS (30), CHONDROCYTES (31), AIRWAY EPITHELIAL CELLS (33) AND HPDL CELLS (6). IN HPDL CELLS, INCREASED EXTRACELLULAR ATP RESULTS IN UPREGULATION OF OPN AND EXPRESSION (6, 26). IN THIS STUDY, WE INVESTIGATED THE MECHANISM OF MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE. OUR RESULTS PROVIDE EVIDENCE THAT IN HPDL CELLS, ATP WAS RELEASED THROUGH CX43 HEMICHANNELS. MOREOVER, THE RELEASE OF ATP RELEASE WAS REGULATED BY AN INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAY.

THE RESULTS OF THIS STUDY ALSO INDICATE HPDL CELLS EXPRESS GAP JUNCTION PROTEINS INCLUDING CX26, 32, 37, 40, 43, 45 AND PANXIN-1, A STUDY BY MAOKA ET AL (34) WHICH FOUND HPDL CELLS EXPRESSED CX32, CX40, CX43 AND CX45. THE FUNCTION OF GAP JUNCTION HEMICHANNELS WAS DEMONSTRATED BY USING CARBENOXOLONE, A NONSPECIFIC GAP JUNCTION BLOCKER. THE EFFECT OF CARBENOXOLONE ON MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE REPORTS THAT GAP JUNCTION HEMICHANNELS ARE INVOLVED IN THE MECHANISM.

OUR FINDINGS ALSO CORRESPOND WITH BENNETT, WHICH SHOWS THAT OTHER SMALL MOLECULES CAN BE RELEASED VIA HEMICHANNEL OPENING. IN OUR STUDY, WE FOUND ON THE ROLE OF CX43 AND CX40. THERE ARE EVIDENCES LINKING CX43 AND CX40 TO THESE HEMICHANNELS IN MANY CELL TYPES. FOR EXAMPLE, HUMAN OSTEOBLAST-LIKE INTACT (HOBIT) CELLS EXPRESSED CX43 AND RELEASED ATP IN RESPONSE TO MECHANICAL STRESS (33). THE EFFLUX OF ATP THROUGH CX43 HEMICHANNELS IN C6 CELLS WAS ALSO IDENTIFIED IN THE MEMBRANE OF HIPPOCAMPAL ASTROCYTES IN PREPARED SLICES (20). IN ADDITION, MECHANICAL STIMULATION MEDIATED ATP RELEASE THROUGH HEMICHANNELS IN AN ISOLATED GLomerular Endothelium (28). BASED ON THE STRONG BLOCKING EFFECTS OF A CX43 INHIBITOR AND CX43 SIRNA, OUR RESULTS INDICATE CX43 AS THE ATP RELEASING CHANNELS IN HPDL CELLS.

THE BALANCE OF RANKL AND OPG IS IMPORTANT FOR OSTEOCLAST FORMATION AND SURVIVAL (36). THEREFORE, INCREASED EXPRESSION OF RANKL, BUT NOT OPG, WOULD INCREASE THE RANKL/OPG RATIO AND PROMOTE OSTEOCLASTOGENESIS. OUR STUDIES REVEALED MECHANICAL STRESS AS WELL AS ATP (26) COULD INDUCE RANKL EXPRESSION, BUT NOT IN HPDL CELLS. IT HAS BEEN REPORTED THAT THERE ARE DIFFERENCES IN REGULATING PATTERNS OF RANKL AND OPG. KANZAKI ET AL. (37) DEMONSTRATED STATIC MECHANICAL COMPRESSION PROMOTED OSTEOCLASTOGENESIS VIA THE UPREGULATION OF RANKL EXPRESSION. RANKL EXPRESSION REMAINED CONSTANT WITHOUT THE APPLICATION OF COMPRESSIVE FORCES IN HPDL CELLS. IN CONTRAST, OPG BUT NOT RANKL WAS UPREGULATED IN HPDL CELLS WHEN THEY WERE TREATED WITH STRAIN OR THROMBIN (38, 39).

TRANSMEMBRANE FLUX OF LOW MOLECULAR WEIGHT DYE, 5(6)-CARBOXYFLUORESCCEIN AMINE, IS A COMMONLY USED METHOD FOR ASSESSING THE PRESENCE AND FUNCTION OF CONNEXINS (40, 41). OUR STUDY SHOWED MECHANICAL STIMULATION OF HPDL CELLS COULD EVOKE BOTH ATP RELEASE AND DYE UPTAKE AS WELL AS ATP RELEASE. THE FACT THAT CX43 INHIBITOR SUPPRESSED DYE UPTAKE DURING MECHANICAL STRESS STIMULATION SUGGESTED CX43 MIGHT BE A MAJOR GAP JUNCTIONAL PROTEIN THAT RESPONDS TO MECHANICAL STRESS. IN ADDITION, THE PRESENT WORK DEMONSTRATED THAT MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE OR DYE UPTAKE REQUIRE CHANNELS. IT IS POSSIBLE THAT THE RELEASE OF ATP BY MECHANICAL STRESS IS NOT A DIRECT EFFECT OF MECHANICAL STRESS BUT IS MEDIATED BY A SIGNALING CASCADE.

THE  $Ca^{2+}$  SIGNALING ASSOCIATED WITH ATP RELEASE HAS BEEN REPORTED IN OSTEOBLASTS. INCREASED INTRACELLULAR  $Ca^{2+}$  HAS BEEN IMPLICATED IN ATP RELEASE FROM MANY CELL TYPES, INCLUDING OSTEOBLAST-LIKE CELLS. FURTHERMORE, REPORTED INCREASE IN CYTOPLASMIC FREE  $Ca^{2+}$  CONCENTRATION COULD TRIGGER CX HEMICHANNELS OPENING (24). IT IS POSSIBLE THAT MECHANICAL STRESS ALTERED INTRACELLULAR  $Ca^{2+}$  LEVELS, LEADING TO THE OPENING OF CX43 HEMICHANNELS, ALTHOUGH THE RELEASE OF ATP IN HPDL CELLS IS IN AGREEMENT WITH THE

ROLE OF INCREASED INTRACELLULAR  $Ca^{2+}$  LEVELS IN ATP RELEASE, APPLICATION OF A BLOCKER COULD INHIBIT MECHANICAL STRESS-INDUCED  $Ca^{2+}$  RELEASE, SUGGESTING THE IMPORTANCE OF  $Ca^{2+}$  AND CX43 IN REGULATING MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE IN HPDL CELLS.

THE QUESTION REMAINS WHETHER STRESS INDUCED ATP RELEASE OR ATP RELEASE INDUCED MECHANICAL STRESS. GENERALLY, THE AMOUNT OF INTRACELLULAR ATP IS IN THE MOLIMOLAR RATIO OF 1:1. INDICATED INCREASED EXTRACELLULAR ATP COULD BE DETECTED WITHIN A MINUTE AFTER MECHANICAL STRESS APPLICATION. TAKEN TOGETHER, IT IS REASONABLE TO POSTULATE THAT MECHANICAL STRESS INDUCED ATP RELEASE FROM INTRACELLULAR STORAGE.

IN CONCLUSION, THE PRESENT STUDY SHOWED MECHANICAL STRESS INDUCED ATP RELEASE THROUGH CX43 HEMICHANNELS. THE MECHANISM OF ATP RELEASE MAY DEPEND ON THE INTRACELLULAR  $Ca^{2+}$  SIGNALING PATHWAY. OUR RESULTS INDICATE AN IMPORTANT ROLE OF CX43 HEMICHANNELS IN THE FUNCTION AND BEHAVIOR OF HPDL CELLS. HOWEVER, THE MECHANISM OF SURFACE RECEPTORS, RESPONDING TO MECHANICAL STRESS IS STILL IN QUESTION AND NEEDS FURTHER INVESTIGATION.

**Acknowledgements**

THIS WORK WAS SUPPORTED BY THAILAND RESEARCH FUND GRANT NO RSA/2559/001, CHULALONGKORN UNIVERSITY CENTENARY ACADEMIC DEVELOPMENT PROJECT, 100<sup>TH</sup> ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (RATCHADAPHISEK SOMPHIEN FUND), AND THE ROYAL GOLDEN JUBILEE SCHOLARSHIP FROM THE THAILAND RESEARCH FUND.

THE AUTHORS WOULD LIKE TO THANK THE FACULTY MEMBERS OF THE DEPARTMENT OF MAXILLOFACIAL SURGERY FOR THEIR HELP IN PERIODONTAL TISSUE COLLECTION AND MANAKAWINCHOKE FOR HER TECHNICAL ASSISTANCE THROUGHOUT THE PROJECT.

## References

1. BURNSTOCK G. THE PAST, PRESENT AND FUTURE OF PURINE NUCLEOTIDES AND NUCLEOTIDE MOLECULES. *Neuropharmacology* 1997;**36**:1127-1139.
2. NAKANO Y, ADDISON WN, KAARTINEN M. ATP-MEDIATED MINERALIZATION OF MC3T3-E1 OSTEOBLAST CULTURE. *JBMR* 1997;**11**:549-561.
3. ORRISS IR, UTTING JC, BRANDAO-BURCH A, ET AL. EXTRACELLULAR NUCLEOTIDE-MEDIATED MINERALIZATION IN VITRO: EVIDENCE FOR DUAL INHIBITORY MECHANISMS INVOLVING P2U AND P2Y RECEPTORS AND PYROPHOSPHATE. *Endocrinology* 2007;**148**:4208-4216.
4. KAWASE T, OKUDA K, YOSHIDA K. EXTRACELLULAR ATP AND ATPGAMMAS SUPPRESS THE PROLIFERATION OF HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS BY DIFFERENT MECHANISMS. *Periodontol* 2007;**78**:748-756.
5. STOUT CE, COSTANTIN JL, NAUS CC, CHARLES AC. INTERCELLULAR CALCIUM SIGNALING BETWEEN ASTROCYTES VIA ATP RELEASE THROUGH CONNEXIN HEMICHANNELS. *J Neurosci* 2002;**27**:10482-10488.
6. WONGKHANTEE S, YONGCHAITRAKUL T, PAVASANT P. MECHANICAL STRESS INDUCED ATP RELEASE VIA ATP/P2Y1 IN PERIODONTAL CELLS. *J Periodontol* 2008;**87**:564-568.
7. WAN J, RISTENPART WD, STONE HA. DYNAMICS OF SHEAR-INDUCED ATP RELEASE FROM ENDOTHELIAL BLOOD CELLS. *Proc Natl Acad Sci* 2008;**105**:16432-16437.
8. BOUDREAULT F, GRYGORCZYK R. CELL SWELLING-INDUCED ATP RELEASE IS TIGHTLY COUPLED WITH INTRACELLULAR CALCIUM ELEVATION. *J Biol Chem* 2001;**276**:51499-51503.
9. ZHAO HB, YU N, FLEMING CR. GAP JUNCTIONAL HEMICHANNEL-MEDIATED ATP RELEASE REGULATES HEARING CONTROLS IN THE INNER EAR. *Proc Natl Acad Sci* 2007;**104**:18724-18729.
10. LAZAROWSKI ER, BOUCHER RC, HARDEN TK. MECHANISMS OF RELEASE OF NUCLEOTIDES AND NUCLEOTIDE PHOSPHATES: INTEGRATION OF THEIR ACTION AS P2X- AND P2Y-RECEPTOR ACTIVATING MOLECULES. *Pharmacol* 2003;**64**:785-795.



11. OVIEDO-ORTA E, EVANS WH. GAP JUNCTIONS AND CONNEXINS: POTENTIAL CONTR  
IMMUNOLOGICAL SYNAPSE. *Biol* 2002;**72**:636-642.
12. EBIHARA L. NEW ROLES FOR CONNEXONS. *Neurosci* 2003;**18**:100-103.
13. GOMES P, SRINIVAS SP, VAN DRIESSCHE W, VEREECKE J, HIMPENS B. ATP REL  
THROUGH CONNEXIN HEMICHANNELS IN CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS.  
2005;**46**:1208-1218.
14. ANSELM F, HERNANDEZ VH, CRISPINO G, ET AL. ATP RELEASE THROUGH C  
HEMICHANNELS AND GAP JUNCTION TRANSFER OF SECOND MESSENGERS PROPAG  
ACROSS THE INNER EAR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:18770-18775.
15. GENETOS DC, KEPHART CJ, ZHANG Y, YELLOWLEY CE, DONAHUE HJ. OSCILLATING I  
ACTIVATION OF GAP JUNCTION HEMICHANNELS INDUCES ATP RELEASE FROM  
OSTEOCYTES. *J Cell Physiol* 2007;**112**:207-214.
16. HUANG YJ, MARUYAMA Y, DVORYANCHIKOV G, ET AL. THE ROLE OF PAN  
HEMICHANNELS IN ATP RELEASE AND CELL-CELL COMMUNICATION IN MOUSE TA  
*Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:6436-6441.
17. RANSFORD GA, FREGIEN N, QIU F, ET AL. PANNEXIN 1 CONTRIBUTES TO ATP RELEAS  
EPITHELIA. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;**41**:525-534.
18. ELTZSCHIG HK, ECKLE T, MAGER A, ET AL. ATP RELEASE FROM ACTIVATED NEUTR  
VIA CONNEXIN 43 AND MODULATES ADENOSINE-DEPENDENT ENDOTHELIAL CELL  
*Res* 2006;**99**:1100-1108.
19. FAIGLE M, SEESSLE J, ZUG S, EL KASMI KC, ELTZSCHIG HK. ATP RELEASE FROM V  
ENDOTHELIA OCCURS ACROSS CX43 HEMICHANNELS AND IS ATTENUATED DURING  
*One* 2008;**3**:E2801.
20. KANG J, KANG N, LOVATT D, ET AL. CONNEXIN 43 HEMICHANNELS ARE PERMEABL  
*Neurosci* 2008;**28**:4702-4711.

21. RALPHS JR, BENJAMIN M, WAGGETT A. REGIONAL DIFFERENCES IN CELL SHAPE AND  
JUNCTION EXPRESSION IN RAT ACHILLES TENDON: RELATION TO FIBROCARILAG  
*Anat* 1998;**193**:215-222.
22. YAMAGUCHI DT, MA D, LEE A, HUANG J, GRUBER HE. ISOLATION AND CHARACTER  
GAP JUNCTIONS IN THE OSTEOBLASTIC MC3T3-B1/C127 CELL LINE. 1994;**9**:791-  
803.
23. YAMAOKA Y, SAWA Y, EBATA N, ET AL. DOUBLE EXPRESSIONS OF CONNEXIN 43  
HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLASTS. 2005;**32**:338-351
24. PEARSON RA, DALE N, LLAUDET E, MOBBS P. ATP RELEASED VIA GAP JU  
HEMICHANNELS FROM THE PIGMENT EPITHELIUM REGULATES NEURAL RETI  
PROLIFERATION. *Neuron* 2005;**46**:731-744.
25. KNIGHT MM, MCGLASHAN SR, GARCIA M, JENSEN CG, POOLE CA. ARTICULAR CHON  
EXPRESS CONNEXIN 43 HEMICHANNELS AND P2 RECEPTORS - A PUTATIVE MEC  
COMPLEX INVOLVING THE PRIMARY CILIA. 2009;**114**:275-283.
26. LUCKPROM P, WONGKHANTEE S, YONGCHAITRAKUL T, PAVASANT P. ADENOSINE T  
STIMULATES RANKL EXPRESSION THROUGH P2Y1 RECEPTOR-CYCLO-OXYGENAS  
PATHWAY IN HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS. 2010;**45**:404-411
27. WONGKHANTEE S, YONGCHAITRAKUL T, PAVASANT P. MECHANICAL STRESS INDUC  
EXPRESSION IN HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS THROUGH RHO KINASE  
2007;**78**:1113-1119.
28. TOMA I, BANSAL E, MEER EJ, ET AL. CONNEXIN 40 AND ATP-DEPENDENT INTERCELLU  
CALCIUM WAVE IN RENAL GLOMERULAR ENDOTHELIAL CELLS. *Segr Comp  
Physiol* 2008;**294**:R1769-R1776.
29. DE VUYST E, DECROCK E, CABOOTER L, ET AL. INTRACELLULAR CALCIUM CH  
CONNEXIN 32 HEMICHANNEL OPENING. 2006;**25**:34-44.



30. FURUYA K, SOKABE M, FURUYA S. CHARACTERISTICS OF SUBEPITHELIAL FIBROBLASTS AS MECHANO-SENSOR IN THE INTESTINE: CELL-SHAPE-DEPENDENT ATP RELEASE AND SIGNALING. *Cell* 2005;**118**:3289-3304.
31. GRAFF RD, LAZAROWSKI ER, BANES AJ, LEE GM. ATP RELEASE BY MECHANICALLY STIMULATED PORCINE CHONDRONS IN PELLET CULTURE. *J Biol Chem* 2000;**275**:15741-15749.
32. HOMOLYA L, STEINBERG TH, BOUCHER RC. CELL TO CELL COMMUNICATION IN RESPONSE TO MECHANICAL STRESS VIA BILATERAL RELEASE OF ATP AND UTP IN POLARIZED EPITHELIAL CELLS. *Biol* 2000;**150**:1349-1360.
33. ROMANELLO M, PANI B, BICEGO M, D'ANDREA P. MECHANICALLY INDUCED ATP RELEASE FROM HUMAN OSTEOBLASTIC CELLS. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;**289**:1275-1281.
34. YAMAOKA Y, SAWA Y, EBATA N, IBUKI N, YOSHIDA S. CULTURED PERIODONTAL FIBROBLASTS EXPRESS DIVERSE CONNEXINS. *J Biol Chem* 1992;**267**:3753-3758.
35. BENNETT MV, CONTRERAS JE, BUKAUSKAS FF, SÁEZ JC. NEW ROLES FOR ASTROCYTES: JUNCTION HEMICHANNELS HAVE SOMETHING TO COMMUNICATE. *Cell* 2003;**26**:610-617.
36. HOFBAUER LC, HEUFELDER AE. ROLE OF RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR- $\kappa$ B LIGAND AND OSTEOPROTEGERIN IN BONE METABOLISM. *J Bone Miner Res* 2000;**15**:243-253.
37. KANZAKI H, CHIBA M, SHIMIZU Y, MITA T. PERIODONTAL LIGAMENT CELLS UNDER MECHANICAL STRESS INDUCE OSTEOCLASTOGENESIS BY RECEPTOR ACTIVATOR OF TGF- $\beta$ 1 LIGAND UP-REGULATION VIA PROSTAGLANDIN- $\text{H}_2$  SYNTHESIS. *J Bone Miner Res* 2002;**17**:210-220.
38. TSUJI K, UNO K, ZHANG GX, TAMURA M. PERIODONTAL LIGAMENT CELLS UNDER TENSILE STRESS REGULATE MRNA EXPRESSION OF OSTEOPROTEGERIN AND TISSUE MATRIX METALLOPROTEASE-1 AND -2. *J Bone Miner Res* 2004;**19**:1004-1014.

39. ARAYATRAKOOLLIKIT U, PAVASANT P, YONGCHAITRAKUL T. THROMBIN INDUCES SYNTHESIS VIA PHOSPHATIDYLINOSITOL 3'-KINASE/MAMMALIAN TARGET OF RAP IN HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS. *J Periodontol* 2008;**43**:537-543.
40. LI H, LIU TF, LAZRAK A, ET AL. PROPERTIES AND REGULATION OF GAP JUNCTIONAL IN THE PLASMA MEMBRANES OF CULTURED C1916, *Cell* 1995;**81**:1019-1030.
41. VERGARA L, BAO X, BELLO-REUSS E, REUSS L. DO CONNEXIN 43 GAP-JUNCTIONAL HEMICHANNELS ACTIVATE AND CAUSE CELL DAMAGE DURING ATP DEPLETION IN OSTEOBLASTS? *Acta Physiol Scand* 2003;**159**:33-38.
42. COTRINA ML, LIN JH, ALVES-RODRIGUES A, ET AL. CONNEXINS REGULATE CALCIUM RELEASE BY CONTROLLING ATP RELEASE. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:15735-15740.
43. GENETOS DC, GEIST DJ, LIU D, DONAHUE HJ, DUNCAN RL. FLUID SHEAR-INDUCED SECRETION MEDIATES PROSTAGLANDIN RELEASE IN MC3T3-E1 OSTEOBLASTS. *J Bone Min Res* 2005;**20**:41-49.
44. LIU D, GENETOS DC, SHAO Y, ET AL. ACTIVATION OF EXTRACELLULAR-SIGNAL REG (ERK1/2) BY FLUID SHEAR IS CA(2+)- AND ATP-DEPENDENT IN MC3T3-E1 OSTEOBLASTS. *Bone* 2008;**42**:644-652.
45. SCHWIEBERT EM. EXTRACELLULAR ATP-MEDIATED PROPAGATION OF CA(2+) WAVES IN OSTEOBLASTS. "MECHANICAL STRAIN-INDUCED CA(2+) WAVES ARE PROPAGATED VIA ATP RELEASE AND PURINERGIC RECEPTOR ACTIVATION". *Am J Physiol* 2000;**279**:C281-C283.

**Figure Legends**

**FIG. 1 MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE IN HPDL CELLS**

LUCIFERIN-LUCIFERASE ASSAY WAS USED TO DETERMINE THE AMOUNT OF HPDL CELLS WERE TREATED WITH DIFFERENT LEVELS OF MECHANICAL STRESS RANGING FROM 0.5 G/CM<sup>2</sup> TO 2.5 G/CM<sup>2</sup> AND THE AMOUNT OF ATP RELEASED WAS MEASURED (A). MAXIMUM EXTRACELLULAR ATP LEVEL WAS OBSERVED AT 2.5 G/CM<sup>2</sup> STRESS WAS APPLIED. THEREFORE, THIS LOADING FORCE WAS USED IN ALL LATER EXPERIMENTS. (B) THE AMOUNT OF ATP RELEASED FROM HPDL CELLS WAS MEASURED FROM 1 MIN TO 120 MIN AFTER A 2.5 G/CM<sup>2</sup> STRESS TREATMENT. THE RESULTS SHOW MECHANICAL STRESS COULD INDUCE ATP RELEASE IN A DOSE AND TIME DEPENDENT MANNER. THE EXTRACELLULAR ATP LEVEL WAS OBSERVED WHEN STRESS WAS APPLIED FOR 5 MIN. THE RESULTS ARE EXPRESSED AS MEAN FROM THREE SEPARATE EXPERIMENTS. \*SIGNIFICANT DIFFERENCE, P < 0.05.

**FIG. 2 THE RELEASE OF ATP WAS ATTENUATED BY A GAP JUNCTION INHIBITOR.**

MECHANICAL STRESS (2.5 G/CM<sup>2</sup>) WAS APPLIED ON CULTURED HPDL CELLS AND 2 HTO INDUCE ATP RELEASE (A) AND RANKL UPREGULATION (B). IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF A GAP JUNCTION INHIBITOR CARBENOXOLONE. THE INHIBITOR WAS ADDED BEFORE STRESS APPLICATION. CARBENOXOLONE COULD ATTENUATE THE EFFECT OF MECHANICAL STRESS ON ATP RELEASE (A) AND RANKL UPREGULATION AS JUDGED BY REVERSE TRANSCRIPTION PCR (RT-PCR) (B).

(C) REVEALED THE EXPRESSION OF GAP JUNCTION PROTEINS INCLUDING CONNEXIN 40, 43, 45 AND PANNEXIN-1 IN HPDL CELLS BY RT-PCR. RANKL; RECEPTOR ACTIVATOR OF TGF- $\beta$ 1 NUCLEAR FACTOR KB LIGAND, OPG; OSTEOPROTEGERIN, GAPDH; GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE, CX; CONNEXIN, PX; PANNEXIN. EXPRESSED AS MEAN FROM THREE INDIVIDUAL EXPERIMENTS. \*SIGNIFICANT DIFFERENCE, P < 0.05.

FIG. 3 MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE AND RANKL UPREGULATION W  
INHIBITED BY A CX43 INHIBITOR

MECHANICAL STRESS (2.5 WAS APPLIED ON CULTURED HPDL CELLS IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF 20  $\mu$ M MECLOFENAMIC ACID SODIUM SALT (CX43 INHIBITOR) OR 100  $\mu$ M (CX40 INHIBITOR). INHIBITORS WERE ADDED 30 MIN PRIOR TO STRESS APPLICATION. CULTURE MEDIUM WAS COLLECTED AFTER 5 MIN AND ATP WAS MEASURED USING A LUCIFERIN-LUCIFERASE ASSAY. RNA AND PROTEIN WERE EXTRACTED AFTER STRESS APPLICATION, RESPECTIVELY. RESULTS SHOWED THE CX43 INHIBITOR, BUT NOT CX40, COULD INHIBIT MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE (A) AND UPREGULATION OF RANKL, BUT NOT OPG, AT BOTH MRNA (B) AND PROTEIN LEVEL (C). RANKL; RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR KB LIGAND, OPG; OSTEOPROTECTIN; GAPDH; GLYCERALDEHYDES-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE. RESULTS ARE EXPRESSED AS MEAN  $\pm$  SD FROM THREE INDIVIDUAL EXPERIMENTS. \*SIGNIFICANT DIFFERENCE,  $P < 0.05$ .

FIG. 4 KNOCKDOWN OF CX43 SUPPRESSED THE INDUCTIVE EFFECT OF MECHANICAL STRESS ON ATP RELEASE.

A AND B SHOW THE MRNA AND PROTEIN LEVELS OF CX43 IN HPDL CELLS RESPONDING TO MECHANICAL STRESS AFTER TRANSFECTION WITH CX43 SMALL INTERFERING (SI) RNA. C AND D SHOW THE EFFECT OF CX43 SIRNA ON ATP RELEASE. TRANSFECTION INHIBITED THE INDUCTIVE EFFECT OF MECHANICAL STRESS-INDUCED ATP RELEASE. THE CONTROL SIRNA (SICTRL) AND THE ADDITION OF TRANSFECTION REAGENT ALONE HAD NO EFFECT. THE RESULTS ARE EXPRESSED AS MEAN  $\pm$  SD FROM THREE INDIVIDUAL EXPERIMENTS. \*SIGNIFICANT DIFFERENCE,  $P < 0.05$ .

FIG. 5 MECHANICAL STRESS INDUCED OPENING OF CX43-HEMICHANNELS IN HPDL CELLS

HPDL CELLS WERE INCUBATED WITH 5 MM 5(6)-CARBOXYFLUORESCCEIN WITH 2.5 G/CM<sup>2</sup> OF MECHANICAL STRESS FOR 5 MIN. MECLOFENAMIC ACID SODIUM S INHIBITOR) OR SPERMINE (CX40 INHIBITOR) WAS ADDED 30 MIN PRIOR TO STRESS CULTURES WERE WASHED WITH PBS AND TYRODE’S SOLUTION, AND OBSERVED UND MICROSCOPE. THE PRESENCE OF FLUORESCENCE SIGNAL INDICATED THE INFLUX OF C INTO THE CELLS AFTER STRESS APPLICATION (A-B). ADDITION OF CX43 (C-D) AND INHIBITORS REDUCED THE FLUORESCENCE SIGNAL IN HPDL CELLS. INTRACELLULAR FLUORESCENT ANALYSIS, THE CX43 INHIBITOR APPEARS TO BE MORE EFFECTIVE INHIBITOR. SCALE BAR = 50 μM.

FIG. 6 THE MECHANISM OF ATP RELEASE DEPEND ON INTRACELLULAR CALCIUM SIGNAL

HPDL CELLS WERE PRE-TREATED WITH THE INTRACELLULAR CALCIUM INHIBIT THAPSIGARGIN (B), IP3 INHIBITORS HEPARIN (C) AND 2-APB (D) FOR 30 MIN PRIOR TO M STRESS APPLICATION. ALL INHIBITORS COULD SIGNIFICANTLY INHIBIT ATP RELE MECHANICAL STRESS. RESULTS ARE EXPRESSED FROM THREE INDIVIDUAL EXPERIMENTS \*SIGNIFICANT DIFFERENCE, P < 0.05.

FIG. 7 BLOCKAGE OF CARBOXYFLUORESCCEIN INFLUX BY THAPSIGARGIN AND 2APB.

HPDL CELLS WERE INCUBATED WITH THAPSIGARGIN OR 2APB FOR 30 MIN PRIOR MECHANICAL STRESS APPLICATION. ADDITION OF CARBOXYFLUORESCCEIN RESULTED IN THE FLUORESCENCE INTO THE CELLS AFTER STRESS APPLICATION (A-B). THE PRESENCE OF 2APB INHIBITED THE UPTAKE OF CARBOXYFLUORESCCEIN (C-F), INDICATING THE INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAY AND IP3 RECEPTOR IN STRESS-INDUCED HEM OPENING. SCALE BAR = 50 μM.

**Table 1: Details of primers used in this study.**

Gene	Accession number	Forward Primer Sequence (5' → 3')	Reverse Primer Sequence (5' → 3')	Product size (bp)
RANKL	NM 033012.3	CCAGCATCAAAATCCCAAGT	CCCCTTCAGATGATCCTTC	602
OPG	NM 002546.3	TCAAGCAGGAGTGCAATCG	AGAATGCCTCCTCACACAGG	341
PX1	NM 015368.3	GGATCCTGAGAAACGACAGC	CTCTGTCGGGCATTCTTCTC	496
CX26	NM 004004.5	GCAGAGACCCCAACGCCGAGAC	GCAGACAAAGTCGGCCTGCTCA	239
CX32	NM 001097642.2	CTGCTCTACCCGGGCTATGC	CAGGCTGAGCATCGGTCGCTCT	330
CX37	NM 002060.2	GGTGGGTAAGATCTGGCTGA	ATAGGTGCCCATCAGTGCTC	406
CX40	NM 181703.2	GGGAGGCCATATTATTGCTG	GTGGCAGAGAAGGCAGAACT	486
CX43	NM 000165.3	GGACATGCACTTGAAGCAGA	CAGCTTGTACCCAGGAGGAG	496
CX45	NM 001080383.1	CACGGTGAAGCAGACAAGAA	GCAAAGGCCTGTAACACCAT	417
CX50	NM 005267.3	TCATCCTGTTCATGTTGTCTGTGGC	AACCTCGGTCAAGGGGAAATAGT	238
GAPDH	NM 002046.3	TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT	TCACACCCATGACGAACATGG	395

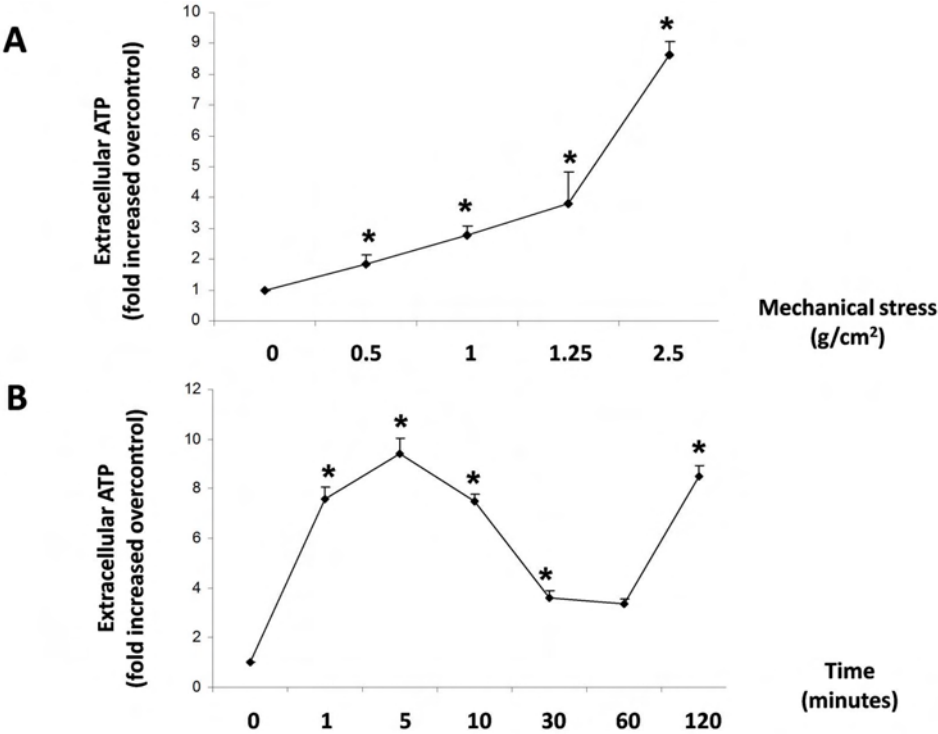


Fig. 1 Mechanical stress-induced ATP release in HPDL cells  
Luciferin-luciferase assay was used to determine the amount of ATP release. HPDL cells were treated with different levels of mechanical stress ranging from 0 to 2.5 g/cm<sup>2</sup> and the amount of ATP released was measured (A). Maximum extracellular ATP level was observed when a 2.5 g/cm<sup>2</sup> stress was applied, therefore, this loading force was used in all later experiments. (B) The amount of ATP released from HPDL cells was measured from 1 min to 2 h after a 2.5 g/cm<sup>2</sup> stress treatment. The results show mechanical stress could induce ATP release in a dose and time dependent manner. The maximum extracellular ATP level was observed when a 2.5 g/cm<sup>2</sup> stress was applied for 5 min. The results are expressed as mean  $\pm$  SD from three separate experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

72x55mm (600 x 600 DPI)

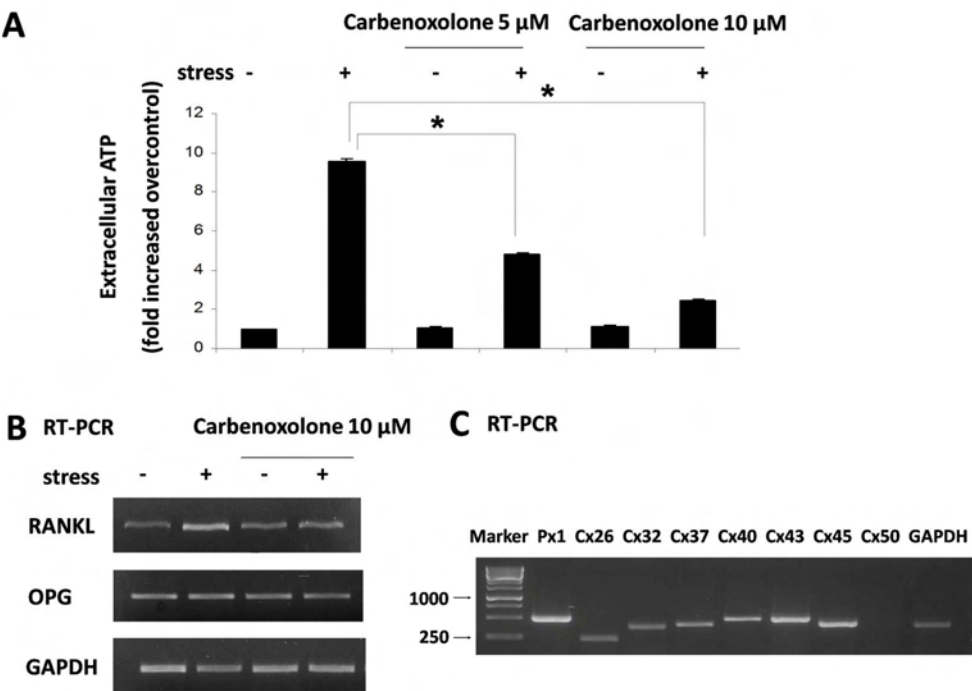


Fig. 2 The release of ATP was attenuated by a gap junction inhibitor. Mechanical stress (2.5 g/cm<sup>2</sup>) was applied on cultured HPDL cells for 5 min and 2 h to induce ATP release (A) and RANKL upregulation (B) respectively, in the presence or absence of a gap junction inhibitor carbenoxolone. The inhibitor was added 30 min prior to stress application. Carbenoxolone could attenuate the effect of mechanical stress on ATP release (A) and RANKL upregulation as judged by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (B). (C) revealed the expression of gap junction proteins including connexin 26, 32, 37, 40, 43, 45 and pannexin-1 in HPDL cells by RT-PCR. RANKL; receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, OPG; osteoprotegerin, GAPDH; glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, Cx; connexin, Px; pannexin. Results are expressed as mean  $\pm$  SD from three individual experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

70x52mm (600 x 600 DPI)



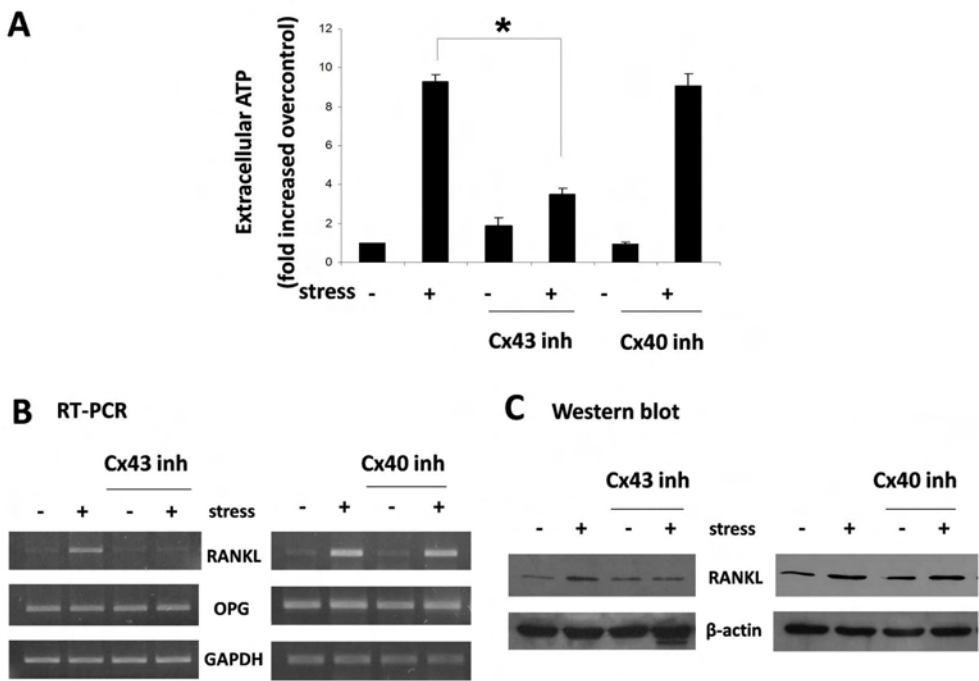


Fig. 3 Mechanical stress-induced ATP release and RANKL upregulation was strongly inhibited by a Cx43 inhibitor

Mechanical stress (2.5 g/cm<sup>2</sup>) was applied on cultured HPDL cells in the presence or absence of 20 μM meclofenamic acid sodium salt (Cx43 inhibitor) or 100 μM spermine (Cx40 inhibitor). Inhibitors were added 30 min prior to stress application. Culture medium was collected after 5 min and ATP was measured using a Luciferin-luciferase assay. RNA and protein were extracted after 2 h and 4 h stress application, respectively. Results showed the Cx43 inhibitor, but not Cx40 inhibitor, could inhibit mechanical stress-induced ATP release (A) and upregulation of RANKL, but not OPG, at both mRNA (B) and protein level (C). RANKL; receptor activator of nuclear factor κB ligand, OPG; osteoprotegerin, GAPDH; glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. Results are expressed as mean ± SD from three individual experiments. \*Significant difference, *p* < 0.05.

69x51mm (600 x 600 DPI)

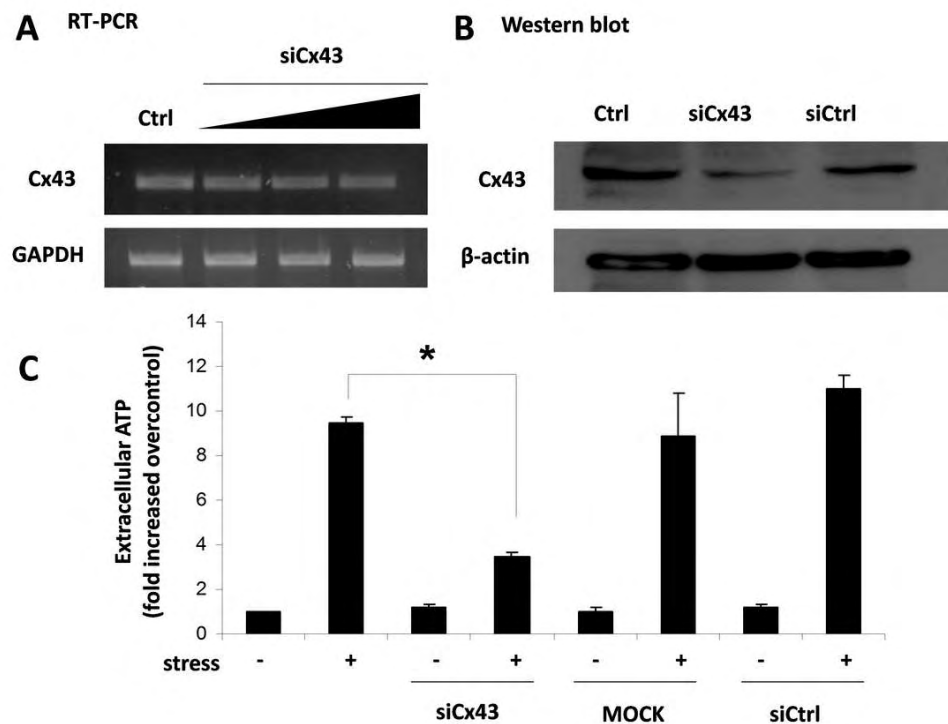


Fig. 4 Knockdown of Cx43 suppressed the inductive effect of mechanical stress on ATP release. A and B show the mRNA and protein levels of Cx43 in HPDL cells respectively, after transfection with Cx43 small interfering (si) RNA. Graph in C indicates Cx43 siRNA transfection inhibited the inductive effect of mechanical stress-induced ATP release while the control siRNA (siCtrl) and the addition of transfection reagent alone (MOCK) had no effect. The results support a role of Cx43 in ATP release. Results are expressed as mean  $\pm$  SD from three individual experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

48x36mm (600 x 600 DPI)

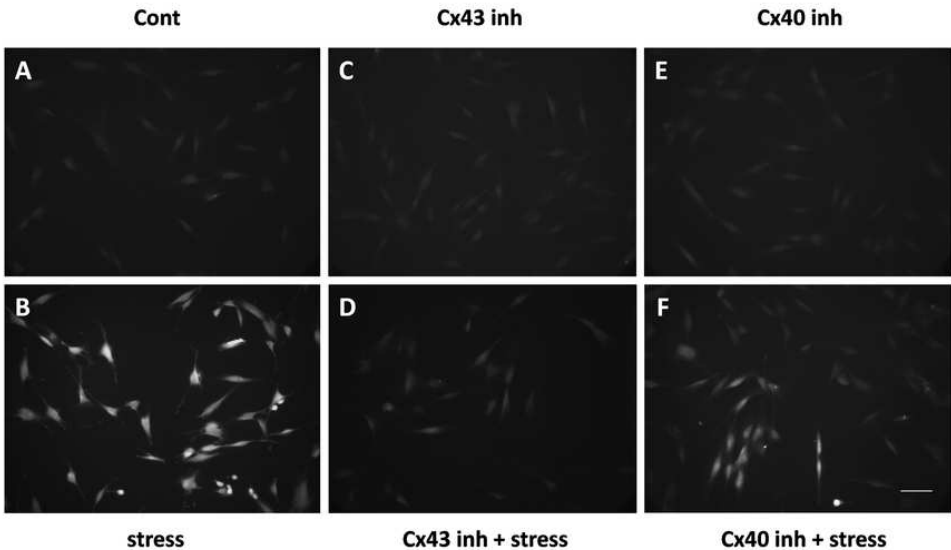


Fig. 5 Mechanical stress induced opening of Cx43-hemichannels in HPDL cells. HPDL cells were incubated with 5 mM 5(6)-carboxyfluorescein prior to treatment with 2.5 g/cm<sup>2</sup> of mechanical stress for 5 min. Meclofenamic acid sodium salt (Cx43 inhibitor) or spermine (Cx40 inhibitor) was added 30 min prior to stress application. Cultures were washed with PBS and Tyrode's solution, and observed under a fluorescent microscope. The presence of fluorescence signal indicated the influx of carboxyfluorescein into the cells after stress application (A-B). Addition of Cx43 (C-D) and Cx40 (E-F) inhibitors reduced the fluorescence signal in HPDL cells receiving mechanical stress. By fluorescent analysis, the Cx43 inhibitor appears to be more effective than the Cx40 inhibitor. Scale bar = 50  $\mu$ m.

38x24mm (600 x 600 DPI)

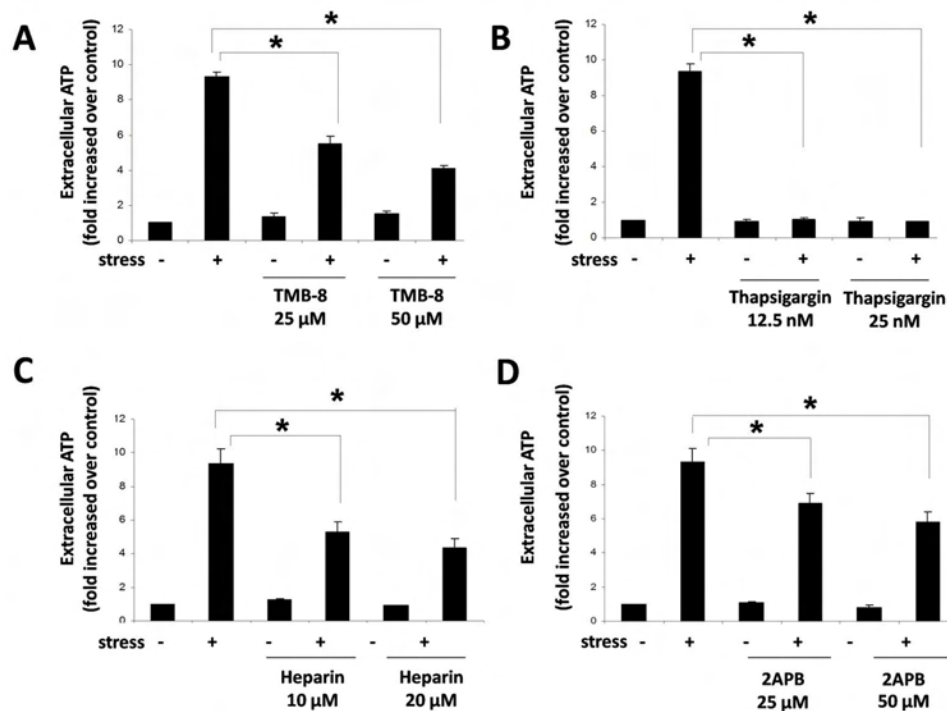


Fig. 6 The mechanism of ATP release depend on intracellular calcium signaling. HPDL cells were pre-treated with the intracellular calcium inhibitor TMB-8 (A), thapsigargin (B), IP3 inhibitors heparin (C) and 2-APB (D) for 30 min prior to mechanical stress application. All inhibitors could significantly inhibit ATP release induced by mechanical stress. Results are expressed as mean  $\pm$  SD from three individual experiments. \*Significant difference,  $p < 0.05$ .

69x50mm (600 x 600 DPI)

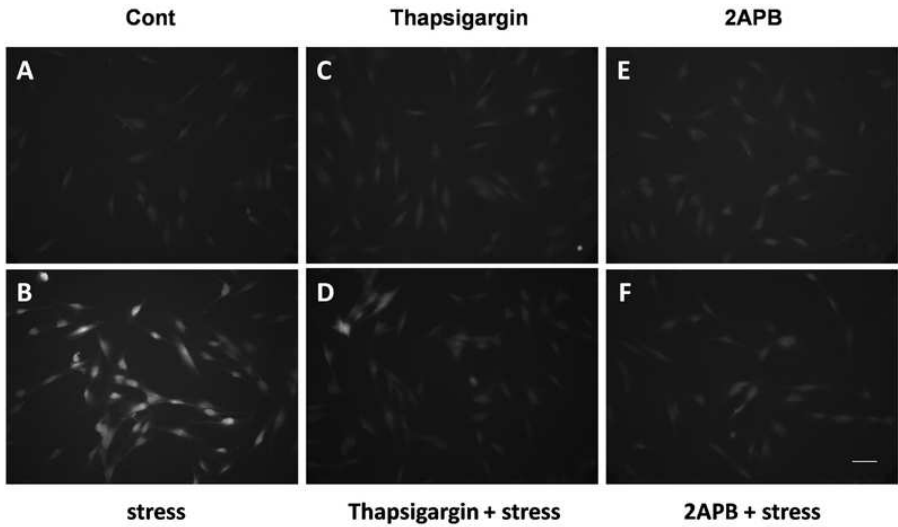


Fig. 7 Blockage of carboxyfluorescein influx by thapsigargin and 2APB. HPDL cells were incubated with thapsigargin or 2APB for 30 min prior to 5 min mechanical stress application. The addition of carboxyfluorescein resulted in the influx of fluorescence into the cells after stress application (A-B). The presence of thapsigargin and 2APB inhibited the uptake of carboxyfluorescein (C-F), indicating the role of an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway and IP3 receptor in stress-induced hemichannel opening. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

37x23mm (600 x 600 DPI)

**Table 1: Details of primers used in this study.**

Gene	Accession number	Forward Primer Sequence (5' → 3')	Reverse Primer Sequence (5' → 3')	Product size (bp)
RANKL	NM 033012.3	CCAGCATCAAAATCCCAAGT	CCCCTTCAGATGATCCTTC	602
OPG	NM 002546.3	TCAAGCAGGAGTGCAATCG	AGAATGCCTCCTCACACAGG	341
PX1	NM 015368.3	GGATCCTGAGAAACGACAGC	CTCTGTGCGGGCATTCTTCTC	496
CX26	NM 004004.5	GCAGAGACCCCAACGCCGAGAC	GCAGACAAAGTCGGCCTGCTCA	239
CX32	NM 001097642.2	CTGCTCTACCCGGGCTATGC	CAGGCTGAGCATCGGTCGCTCT	330
CX37	NM 002060.2	GGTGGGTAAGATCTGGCTGA	ATAGGTGCCCATCAGTGCTC	406
CX40	NM 181703.2	GGGAGGCCATATTATTGCTG	GTGGCAGAGAAGGCAGAACT	486
CX43	NM 000165.3	GGACATGCACTGAAGCAGA	CAGCTTGTACCCAGGAGGAG	496
CX45	NM 001080383.1	CACGGTGAAGCAGACAAGAA	GCAAAGGCCTGTAACACCAT	417
CX50	NM 005267.3	TCATCCTGTTTCATGTTGTCTGTGGC	AACCTCGGTCAAGGGGAAATAGT	238
GAPDH	NM 002046.3	TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT	TCACACCCATGACGAACATGG	395